

NOTE TO USERS

Page(s) missing in number only; text follows. Page(s) were scanned as received.

i

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**La modulation *in vivo* des cellules dendritiques par le GM-CSF
protège contre le diabète de type 1 chez la souris NOD**

Par
Simon Gaudreau

Programme d'immunologie
Faculté de Médecine
Laboratoire de Dr Abdelaziz Amrani et Dr Claire Dubois

Mémoire présenté à la faculté de médecine
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Immunologie

Le 15 septembre 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-17308-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-17308-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
RÉSUMÉ	1
1. INTRODUCTION	2
1.1. Historique de la maladie.....	2
1.2. Modèles du DT1	3
1.2.1. Modèles spontanés	3
1.2.2. Modèles expérimentaux	5
1.3. Contribution de facteurs génétiques et environnementaux à l'étiologie du DT1	5
1.3.1. Facteurs génétiques	5
1.3.2. Facteurs environnementaux.....	7
1.4. Implication du système immunitaire.....	8
1.4.1. Rôle des lymphocytes T	9
1.4.1.1. Évidence de l'implication des lymphocytes T CD4+	10
1.4.1.2. Évidence de l'implication des lymphocytes T CD8+	11
1.4.2. Mécanismes de destruction de la cellule β de l'îlot de Langerhans	12
1.4.2.1. Rôle des lymphocytes T.....	12
1.4.2.2. Rôle des médiateurs pro-inflammatoires	13
1.4.3. Implication des cellules présentatrices d'antigènes.....	15
1.4.3.1. Les lymphocytes B	16
1.4.3.2. Les macrophages	17
1.4.3.3. Les cellules dendritiques.....	17
1.4.4. La cellule dendritique (CD).....	18
1.4.4.1. Origine de la cellule dendritique.....	18
1.4.4.2. Les CD; cellules sentinelles du système immunitaire.....	21
1.4.4.3. Processus migratoire des CD	23
1.4.4.4. Processus d'activation des lymphocytes par les CD	24
1.4.4.5. Les cellules dendritiques et le DT1.....	24
1.4.5. Mécanismes de tolérance.....	26
1.4.5.1. Cellules dendritiques immatures et/ou tolérogènes.....	26
1.4.5.2. Mécanismes moléculaires d'induction de la tolérance par les CD.....	27
1.5. Le GM-CSF et l'inflammation.....	28
2. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	30
3. OBJECTIFS.....	30

4. MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
4.1. Animaux et traitements	31
4.2. Évaluation du diabète	31
4.3. Lignées cellulaires et anticorps	32
4.4. Histopathologie	32
4.5. Peptides	33
4.6. Génération des CD de la moelle osseuse et isolement des CD de la rate	33
4.7. Essais d'activation et de prolifération cellulaire	34
4.8. Essai de prolifération du clone T 8.3-CD8 ⁺ en présence des lymphocytes T CD4 ⁺	34
4.9. Production de cytokines par les lymphocytes T	35
4.10. Transferts adoptifs chez des souris receveuses NOD. <i>SCID</i>	36
4.11. Analyses statistiques	36
5. RÉSULTATS	37
5.1. Génération de CD tolérogènes ayant un phénotype immature <i>in vitro</i>	37
5.2. Le traitement des souris NOD pré-diabétiques avec le GM-CSF protège contre DT1	39
5.3. Le traitement au GM-CSF augmente la quantité de CD chez la souris NOD	42
5.4. Le traitement au GM-CSF induit une augmentation de CD CD11c ^{hi} CD45RB ^{low}	43
5.5. Les CD des souris traitées au GM-CSF ont un phénotype de CD ^{imm}	43
5.6. Les CD des souris traitées au GM-CSF ont une moins grande capacité d'activation du clone T 8.3-CD8 ⁺	45
5.7. Le GM-CSF ne change pas le ratio de lymphocytes T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ , mais induit un phénotype de type Th2	48
5.8. Augmentation de la quantité de lymphocytes T régulateurs CD4 ⁺ CD25 ⁺ chez les souris traitées au GM-CSF	51
5.9. La production importante d'IL-10 et d'IL-4 est médiée par les lymphocytes T CD4 ⁺ CD25 ⁺	51
5.10. Les lymphocytes T CD4 ⁺ CD25 ⁺ inhibent l'activation du clone T 8.3-CD8 ⁺	54

5.11. Les cellules dendritiques des souris NOD traitées au GM-CSF sont essentielles au maintien de la tolérance in vivo	56
6. DISCUSSION	58
7. CONCLUSION	65
8. REMERCIEMENTS	68
9. RÉFÉRENCES.....	69

Liste des Figures

Figure 1.	Histologie de l'îlot du pancréas chez la souris NOD.....	9
Figure 2.	Morphologie des cellules dendritiques.....	19
Figure 3.	Étapes de maturation des CD.....	20
Figure 4.	Analyse phénotypique et fonctionnelle des CD générées à partir de précurseurs de la moelle osseuse chez la souris NOD.....	38
Figure 5.	Incidence du diabète chez les souris NOD femelles traitées au GM-CSF.....	40
Figure 6.	Le GM-CSF atténue la progression de l'insulite.....	41
Figure 7.	Pourcentage de CD isolées de souris traitées au GM-CSF ou au PBS.....	42
Figure 8.	Phénotype des CD provenant de la rate des souris traitées au GM-CSF par rapport aux souris témoins traitées au PBS.....	44
Figure 9.	Effet inhibiteur du GM-CSF sur l'expression des marqueurs de surface des CD spléniques.....	46
Figure 10.	Présentation du peptide NRP-A7 par les APC des souris NOD traitées au GM-CSF ou au PBS.....	47
Figure 11.	Présentation du peptide NRP-A7 par les CD purifiées des souris NOD traitées au GM-CSF ou au PBS.....	48
Figure 12.	Pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ retrouvés dans les ganglions pancréatiques, la rate et les ganglions mésentériques.....	49
Figure 13.	Production de cytokines ex vivo par les lymphocytes T CD4⁺.....	50
Figure 14.	Effet du traitement au GM-CSF sur les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs.....	52
Figure 15.	Production de cytokines <i>ex vivo</i> par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ et CD4⁺CD25⁺.....	53
Figure 16.	Capacité d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T 8.3-CD8⁺ par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁺, provenant des souris traitées au GM-CSF ou témoins.....	55

Figure 17.	Importance des CD dans l'induction de la tolérance <i>in vivo</i>.....	57
Figure 18.	Résumé du rôle du GM-CSF dans la protection contre le DT1 chez la souris NOD	68

Liste des Tableaux

Tableau 1.	Caractéristiques des principaux modèles animaux de diabète spontané comparées à la pathologie chez l'homme.....	4
Tableau 2.	Lignées des cellules dendritiques et leur phénotype chez la souris et l'homme.....	22

Liste des abréviations

AIC	Arthrite rhumatoïde induite au collagène
ARNm	Acide ribonucléique messenger
β_2 M	Bêta-2-microglobuline
CCR	Récepteur des chémokines CC
CD	Cellule(s) dendritique(s)
Ci	Unité de mesure de radioactivité (Curie)
CIITA	<i>Class II transactivator complex</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CPM	Coup par minute
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
CXCL10	Ligand du récepteur des chémokines CXC
CXCR	Récepteur des chémokines CXC
DT1	Diabète de type 1
EAE	Encéphalite autoimmune expérimentale
FACS	Cytométrie en flux
FBS	Sérum bovin fœtal
FITC	Fluorescéine isothiocyanate (Fluorophore)
Flt-3	FMS-like tyrosine kinase
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
Gy	Unité de mesure de radioactivité
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (CMH humain)
HPLC	Chromatographie liquide haute pression
i.p	Injection intra-péritonéale
i.v	Injection intra-veineuse
IFN	Interféron
IGRP	Islet-specific glucose-6-phosphatase
IL	Interleukine

Imm	Immature
iNOS	Oxyde nitrique synthétase
Low	Expression de surface faible d'une molécule
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	<i>Magnetic antibody cell sorting</i>
Mat	Mature
MIP	<i>Macrophage inflammatory chemokine</i>
MLN	Ganglions mésentériques
MOG	Peptide de la <i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
NOR	<i>Non-obese resistant</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PE	R-phycoérythrine (Fluorophore)
PercP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein Complex</i>
PLC	Progéniteurs lymphoïdes communs
PLN	Ganglions pancréatiques
PMC	Progéniteurs myéloïdes communs
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
SCID	<i>Severe combined immune deficiency</i>
SLC	<i>Secondary lymphoid tissue chemokine</i>
TAE	Thyroïdite autoimmune expérimentale
TCR	Récepteur des cellules T
TGF	Facteur de croissance des tumeurs
Th	<i>T helper</i>
TNF	Facteur nécrosant des tumeurs
Tr1 ou T _{reg}	Lymphocytes T régulateurs
U	Unité d'activité enzymatique
UTR	Régions non transcrites de l'ARNm

Résumé

L'induction et le maintien de la tolérance des lymphocytes T spécifiques à l'antigène au niveau périphérique sont essentiels à la prévention des maladies auto-immunes. Dans le cas diabète de type I (DT1), le bris de cette tolérance résulte en une réponse autoimmune complexe dirigée contre les cellules β du pancréas. Cette réponse implique les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi que les cellules dendritiques (CD) et les macrophages. Les souris NOD développent spontanément le DT1 de façon similaire à la maladie chez l'homme, ce qui en fait un excellent modèle pour étudier cette pathologie. Chez ces souris, l'inflammation des îlots (insulite) apparaît aux environs de 2 à 3 semaines après la naissance, et les symptômes cliniques de la maladie se déclarent entre 15 et 20 semaines. Chez la souris NOD, les macrophages et les CD infiltrent les îlots du pancréas avant l'arrivée des lymphocytes T autoréactifs. *In vivo*, les CD proviennent de précurseurs hématopoïétiques qui ont été stimulés avec le granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). Les CD nouvellement différenciées ont un phénotype immature caractérisé par une faible expression du CMH II et des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 ainsi que par leur faible capacité d'activation des lymphocytes T permettant l'induction de la tolérance périphérique.

Basé sur le fait que le GM-CSF permet la génération de CD immatures et que celles-ci sont impliquées dans le maintien de la tolérance périphérique, nous avons étudié l'impact de la modulation *in vivo* des CD par le GM-CSF sur l'évolution de l'inflammation de l'îlot et la destruction des cellules β chez la souris NOD. Dans cette étude, nous avons démontré que l'administration du GM-CSF à des souris NOD induit une diminution de l'inflammation des îlots et une protection contre le DT1. Des analyses fonctionnelles ont révélé que le traitement au GM-CSF n'affecte en rien la capacité d'activation des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ par rapport aux souris témoins. Les CD des souris traitées au GM-CSF possèdent un phénotype immature et ce même après leur stimulation au LPS. De plus, elles ont une faible capacité à stimuler un clone T $CD8^+$ diabétogène, comparativement aux CD des souris témoins. Finalement, le traitement au GM-CSF semble diriger les lymphocytes T $CD4^+$ vers un phénotype Th2 et induit une augmentation des lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ régulateurs au niveau des ganglions périphériques et de la rate.

1. Introduction

Le diabète affecte environ 5% de la population et l'incidence de cette maladie est en progression dans les pays développés (Rosmalen 2000). Le diabète de type 1 (DT1) ou insulino-dépendant est une maladie auto-immune causée par une déficience en production d'insuline alors que le diabète de type II (non insulino-dépendant) est caractérisé par une résistance à l'insuline. Le développement du DT1 est le résultat d'une destruction spécifique des cellules β du pancréas productrices de l'insuline par les cellules du système immunitaire (Dilts et coll. 1999). L'élévation de la glycémie et les symptômes cliniques du DT1 tels que l'augmentation du volume des urines, la soif intense, la présence de corps cétoniques et l'amaigrissement surviennent lorsque 90% des cellules β du pancréas sont détruites (Solomon et coll. 2004, Rosmalen et coll. 2000).

1.1. Historique de la maladie

La première évidence indirecte de l'existence du DT1 chez l'homme date de l'antiquité. Les égyptiens ont été les premiers à remarquer que l'urine sucrée des malades diabétiques attirait les abeilles. La nature pancréatique de la maladie est restée énigmatique jusqu'à ce qu'en 1889, des chercheurs remarquent que l'urine sucrée des chiens sans pancréas attire les mouches. C'est seulement en 1921, suite à la découverte de l'insuline et de ses fonctions par Frederick G. Banting, John J. R.

Macleod et Charles Best qu'il a été établi de façon claire que le DT1 est causé par une déficience des cellules β du pancréas à produire de l'insuline.

1.2. Modèles du DT1

L'étude du DT1 est facilitée par l'existence de plusieurs modèles animaux. Il existe des modèles spontanés et des modèles expérimentaux induits par différents types d'interventions.

1.2.1. Modèles spontanés

Deux modèles spontanés de DT1 sont généralement utilisés: la souris NOD (non-obese diabetic) qui a été découverte au Japon à la fin des années 70 et le rat BB (biobred) initialement développé au Canada au début des années 70 (Polychronakos 2004, Solomon et coll. 2004, Serreze et coll. 1994) Dans ces deux modèles, le DT1 se développe spontanément de façon similaire au DT1 chez l'homme (Delovitch et coll. 1997, Serreze et coll. 1994) (Tableau 1). Chez les souris NOD le diabète apparaît entre l'âge de 4 à 6 mois, avec une incidence plus élevée chez les femelles (80-90%) que chez les mâles (20-40%). Le diabète clinique est précédé d'une infiltration des îlots pancréatiques par des cellules mononuclées, un phénomène connu sous le nom d'insulite. L'insulite débute entre 3 et 4 semaines après la naissance, et ce chez les deux sexes. Les rats BB qu'en à eux développent le diabète dès 4 mois. Par contre, ceux-ci présentent une lymphopénie dès leur jeune âge et l'incidence est la même pour les deux sexes (Rosmalen et coll. 2000).

Les différences entre les principaux modèles de DT1 sont décrites dans le Tableau 1. Plusieurs autres modèles de diabète ont été développés au cours des dernières années, incluant des modèles de souris NOD transgéniques ou déficientes en certains gènes (Anderson et coll. 2005). Ceux-ci seront discutés tout au long de ce mémoire.

Tableau 1. Caractéristiques des principaux modèles animaux de diabète spontané comparées à la pathologie chez l'homme.

	Souris NOD	Rat BB	Homme
Association avec le CMH	I-A ^{g7} requis, mais pas suffisant pour le déclenchement du DT1	RT1 ^u requis, mais pas suffisant pour le déclenchement du DT1	Plusieurs haplotypes sont associées au DT1, mais aucun d'entre eux n'est requis ou suffisant pour le déclenchement du DT1
Incidence	80-90% chez les femelles, 20-60% chez les mâles	50-90%	0,1 à 0,4%
Distribution selon le sexe	Femelles > mâles	Femelles = mâles	Femelles = mâles
Âge à l'apparition des symptômes cliniques	3 à 4 mois	3 mois	Tout au long de la vie
Péri-insulite	oui	non	non
Durée de l'insulite	longue	courte	courte à longue
Présence d'autoanticorps	±	±	+
Présence de corps cétoniques	±	+	+
Lymphopénie	±	+	-
Infiltration des leucocytes au niveau d'autres tissus	Dans tous les cas	Dans tous les cas	Quelquefois

(Tableau adapté de Rosmalen et coll. 2002)

1.2.2. Modèles expérimentaux

De nombreux modèles de diabète induits ont été décrits. Dans ces modèles, la destruction des cellules β est provoquée par l'administration d'une forte dose d'agents sélectivement toxiques pour les cellules β tels que l'alloxane ou la streptozotocine (Rees et coll. 2005). Par exemple, l'utilisation de la streptozotocine à faibles doses semble provoquer une réponse immune dirigée contre des cellules β de l'îlot ce qui cause le DT1 (Eisenbarth et coll. 1996). Les détails moléculaires du mode d'action de cet agent ne sont pas encore complètement élucidés, mais il a été suggéré que la streptozotocine pourrait augmenter l'expression de surface des molécules du CMH de classe II sur les cellules β du pancréas (Cockfield et coll. (1989).

1.3. Contribution de facteurs génétiques et environnementaux à l'étiologie du DT1

Le DT1 est une maladie à étiologie multiple. La susceptibilité au DT1 est influencée par des facteurs génétiques et environnementaux (Redondo et coll. 2001, Dahlquist et coll. 1999, Knip et coll. 1999).

1.3.1. Facteurs génétiques

La susceptibilité et la résistance au DT1 sont dues à la présence de formes alléliques protectrices ou au contraire diabétogènes de certains gènes. Plusieurs gènes de susceptibilité au DT1 ont été identifiés, dont un grand nombre ont une forte

association pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) localisé sur le chromosome 6 chez l'homme et sur le chromosome 17 chez la souris NOD (Solomon et coll. 2004, Redondo et coll. 2001, Boitard et coll. 1988, Rotter et coll. 1986).

Chez l'homme, il existe une prédisposition génétique au DT1 liée à certains gènes du système HLA situés sur le bras court du chromosome 6. Ainsi, certains allèles portés par les haplotypes HLA DR3⁺ et DR4⁺ sont des facteurs déterminants de la susceptibilité ou de la résistance à la maladie au niveau du locus HLA-DQ.B1 (Kelly et coll. 2003). Les allèles DQ.B1 codant pour les acides aminés sérine, alanine ou valine en position 57 sont associés à la susceptibilité au diabète, alors que les allèles DQ.B1 qui inclut la séquence codant pour l'acide aminé asparagine en position 57 sont associés avec la résistance au DT1 (Horn et coll. 1988, Todd et coll. 1987). De plus, il a été rapporté que certains allèles de gènes non liés au HLA sont également importants pour la susceptibilité au DT1 chez l'homme. Parmi ceux-ci on retrouve les allèles IDDM2 (polymorphisme au niveau du promoteur du gène codant pour l'insuline), IDDM12 (polymorphisme au niveau de la région codante pour l'acide aminé en position 49 de la structure du CTLA-4) et IDDM18 (polymorphisme dans la région 3'UTR du gène codant pour l'IL-12) (Graham et coll. 2002, Kelly et coll. 2002, Morahan et coll. 2002).

Chez la souris NOD, la susceptibilité au diabète est aussi liée à certains gènes du CMH de classe II. Deux régions sont particulièrement importantes pour la susceptibilité au DT1 (Miyazaki et coll. 1992, Bohme et coll. 1990, Lund et coll. 1990,

Acha-Orbea et coll. 1987). La région de susceptibilité idd3 qui comprend le gène qui code pour la molécule I-A^{g7} du CMH II, lequel est l'équivalent de la molécule DQ.B1 chez l'homme et la région idd13 comprenant le gène qui code pour la molécule β_2M^b (β_2 -microglobuline) Outre les régions de susceptibilité sur les gènes codant pour le CMH, il existe au moins 2 régions diabétogènes idd10 et idd17 qui sont localisées sur le chromosome 3 (Podolin et coll. 1997, Wicker et coll. 1995).

1.3.2. Facteurs environnementaux

Suite à diverses études épidémiologiques, plusieurs agents environnementaux pouvant contribuer à la susceptibilité de développement du DT1 ont été identifiés. Parmi ces facteurs, il y a les infections virales (ex: rubéole, coxsackie), l'alimentation, le stress et certaines toxines (ex: bafilomycine A1) (Kelly et coll. 2002, Varela-Calvino et coll. 2002, Ou et coll. 2000). Jusqu'à présent, aucune étude n'a pu déterminer de façon directe qu'un de ces agents était responsable du déclenchement du DT1, principalement à cause de leur hétérogénéité (Kelly et coll. 2002). Il a donc été proposé qu'une combinaison de ces facteurs environnementaux puisse influencer le risque de développement du DT1 chez les individus ayant une prédisposition génétique à la maladie (Wasmuth et coll. 2000, Dahlquist et coll. 1999).

Le DT1 étant une maladie autoimmune complexe, les prochains chapitres seront consacrés à l'explication de l'implication du système immunitaire dans la pathologie.

1.4. Implication du système immunitaire

Le premier symptôme de la pathologie chez l'homme et la souris NOD est l'accumulation de leukocytes en périphérie des îlots de Langerhans (Jansen et coll. 1994). Chez la souris NOD, cette inflammation précoce (appelée péri-insulite) apparaît à 2 ou 3 semaines après la naissance et précède les premiers symptômes cliniques de la maladie (Fujino-Kurihara et al 1985). Des marquages immunohistochimiques spécifiques aux macrophages et aux cellules dendritiques (CD) (CD11c⁺, ER-MP23⁺ et MOMA-1⁺) ont révélé que ces cellules sont les premières à infiltrer les îlots (Rosmalen et coll. 2000, Dahlen et coll. 1998, Jansen et coll. 1994). Ces événements initiaux sont suivis d'un recrutement massif de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et de lymphocytes B (Jansen et coll. 1994) jusqu'à l'âge de 10 à 12 semaine (Miyazaki et coll. 1985, Jansen et coll. 1994). Cette période est décrite comme un stade d'autoimmunité bénigne, car l'inflammation causée par les cellules infiltrantes n'est pas destructive pour les cellules β (Dilts et coll. 1999, Andre et coll. 1996). Ultérieurement, l'accumulation massive des leukocytes provoque une insulite destructive pour les cellules β (Dilts et coll. 1999, Andre et coll. 1996) (Fig. 1). La composition de l'infiltrat inflammatoire suggère un rôle des lymphocytes T et des CPA (lymphocytes B, macrophages et CD) dans la progression de la pathogénie du DT1.

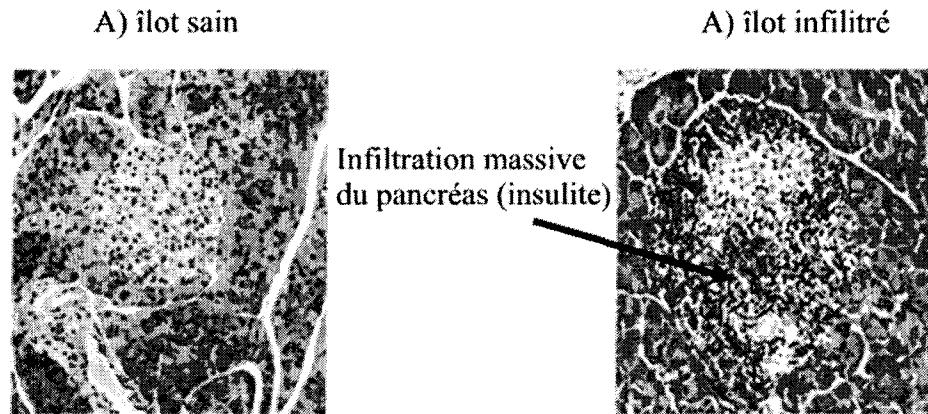


Figure 1. Histologie de l'îlot du pancréas chez la souris NOD. A) Chez une souris NOD pré diabétique. B) Chez une souris NOD diabétique (coloration hématoxyline - eosine).

1.4.1. Rôle des lymphocytes T

Il est bien établi que les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ jouent un rôle important dans l'initiation et la progression du DT1. Par exemple, le traitement des souris NOD pré-diabétique au moyen d'anticorps anti-CD3 ou par des anticorps anti-TCR (provoquant l'élimination des lymphocytes T) protège contre le DT1 (Sempe et coll. 1991, Hayward et coll. 1989). De plus, l'induction du DT1 peut se faire chez les souris NOD.*SCID* immunodéficientes ou NOD irradiées, par le transfert de clones T $CD4^+$ et T $CD8^+$ hautement diabétogènes isolés de souris NOD diabétiques (Yagi et coll. 1992, Thivolet et coll. 1991, Bendelac et coll. 1987). Par contre, ces transferts n'induisent pas le DT1 dans tous les cas. De fait, des études ont montré que le transfert de certains clones T $CD4^+$ diabétogènes purifiés chez des souris NOD.*SCID* ou NOD irradiées, mène à une infiltration massive des cellules β sans pour autant induire le diabète (Christianson et coll. 1993, Thivolet et coll. 1991).

Finalement, des colorations immunohistochimiques des pancréas de souris NOD pré-diabétiques, préalablement injectées avec des splénocytes de souris NOD diabétiques, ont montré que les premiers lymphocytes T infiltrants l'îlot sont les lymphocytes T CD4⁺, suivis des lymphocytes T CD8⁺ (Yagi et coll. 1992, Bedossa et coll. 1989). Ces observations suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ sont essentiels au recrutement des lymphocytes T CD8⁺ et que les principaux effecteurs de la destruction de la cellule β sont les lymphocytes T CD8⁺ (Solomon et coll. 2004, Rosmalen et coll. 2000).

1.4.1.1.Évidence de l'implication des lymphocytes T CD4+

Des expériences ont montré chez les souris NOD pré-diabétiques que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ (avec des anticorps dirigés contre la molécule CD4) protège contre la maladie (Shizuru et coll. 1993). De façon similaire, les souris NOD ayant une délétion du gène CIITA (codant pour la protéine CIITA nécessaire à l'expression des gènes du CMH II) et qui sont dépourvues de lymphocytes T CD4⁺ périphériques ne développent pas le DT1 (Mora et coll. 1999, Shizuru et coll. 1993).

Des travaux additionnels ont permis de mieux comprendre l'implication des lymphocytes T CD4⁺ dans le développement du diabète. Ces travaux ont fait appel à l'utilisation de plusieurs modèles de souris transgéniques ayant un TCR spécifique à

certaines clones T CD4⁺ hautement diabétoogènes (NOD-BDC2.5, NOD-4.1, NOD-BDC6.9) qui développent un diabète accéléré (Haskins 2004, Verdaguer et coll. 1997).

1.4.1.2. Évidence de l'implication des lymphocytes T CD8⁺.

En plus des lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes T CD8⁺ font partie des premiers lymphocytes qui infiltrent les îlots du pancréas de la souris NOD. Ils sont également présents dans la phase finale de l'insulite (Verdaguer et coll. 1996, Wong et coll. 1996). Plusieurs autres travaux ont confirmé l'importance des lymphocytes T CD8⁺ dans la pathologie. Premièrement, les souris NOD déficientes en β_2 -microglobuline (NOD. β_2 -M^{-/-}), qui n'expriment pas le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, ne développent pas d'insulite ni de DT1 (Serreze et coll. 1997, 1994). De façon similaire, la déplétion des lymphocytes T CD8⁺ par injection d'anticorps anti-CD8 neutralisants à des souris NOD pré-diabétiques empêche l'inflammation de l'îlot et protège contre la maladie (Wang et coll. 1996). Finalement, les lymphocytes T CD8⁺ purifiés de souris NOD diabétiques peuvent transférer le diabète à des souris NOD.*SCID* (Wong et coll. 1996, Nagata et coll. 1994).

1.4.2. Mécanismes de destruction de la cellule β de l'îlot de Langerhans

1.4.2.1. Rôle des lymphocytes T

Des expériences de transfert du diabète à l'aide de clones T CD4⁺ spécifiques aux cellules β ont montré que les lymphocytes T CD4⁺ peuvent tuer les cellules β *in vivo*. Cette destruction se fait par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires au sein de l'îlot (TNF- α , IFN- γ , l'IL-1) (Peterson et coll. 1998). Des études complémentaires ont permis de mettre en évidence le fait que les clones T CD4⁺ diabétogènes tuent aussi les cellules β par la voie du récepteur au TNF α (Pakala et coll. 1999) et par la voie Fas-FasL (Amrani et coll. 2000), le récepteur Fas étant induit sur la cellule β par l'IL-1 et le TNF α (Savinov et coll. 2003, Chervonsky et coll. 1997, Yamada et coll. 1996). De plus, les souris NOD.*RAG-2*^{-/-} ou NOD.*SCID* transgéniques ayant un TCR hautement diabétogène restreint au CMH II (I-A^{g7}) exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺, développent le diabète malgré l'absence de lymphocytes T CD8⁺ (Verdaguer et coll. 1997, Kurrer et coll. 1997). Ces études établissent ainsi que les lymphocytes T CD4⁺ diabétogènes détruisent les cellules β lorsqu'ils sont présents en grande quantité (Kurrer et coll. 1997, Verdaguer et coll. 1997).

Plusieurs groupes ont montré que la destruction des cellules β implique aussi les lymphocytes T CD8⁺. Plus particulièrement, les études réalisées avec un modèle de souris NOD exprimant sur les lymphocytes T CD8⁺ un TCR hautement diabétogène (8.3-NOD) (Yang et coll. 2004, DiLorenzo et coll. 1998, Verdaguer et coll. 1996)

spécifique à un épitope de l'autoantigène IGRP (*islet-specific glucose-6-phosphatase*). (Lieberman et coll. 2003). Les souris 8.3-NOD possèdent au niveau des îlots un grand nombre de lymphocytes T CD8⁺ autoréactifs et développent un diabète accéléré (Verdaguer et coll. 1996). Les mécanismes majeurs de destruction des cellules β par les lymphocytes T CD8⁺ impliquent la voie de la perforine-granzyme et celle du Fas-FasL. En effet, malgré la présence d'une insulite importante, les cellules β de l'îlot ne sont pas détruites et l'incidence du DT1 est réduite chez les souris NOD.*PO*^{-/-} déficientes en perforine (Kagi et coll. 1997). Par la suite, Amrani et coll. (1999) ont démontré grâce à la génération de souris 8.3-NOD.*PO*^{-/-} que certains clones T CD8⁺ autoréactifs utilisent exclusivement la voie Fas-FasL pour tuer les cellules β et que celle-ci est importante pour l'apoptose initiale des cellules β . Finalement, les souris NOD déficientes en Fas exclusivement au niveau des cellules β ont une incidence du diabète réduite confirmant ainsi l'importance de la voie Fas-FasL dans la destruction des cellules β (Savinov et coll. 2003).

1.4.2.2. Rôle des médiateurs pro-inflammatoires

Malgré l'importance des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans le mécanisme de destruction des cellules β , il est important de noter que cette destruction n'est pas due exclusivement aux interactions directes entre les lymphocytes T et les cellules β . En effet, la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, tel que le TNF α , l'IL-1 et l'oxyde nitrique (NO) par les lymphocytes T et les macrophages sont des voies importantes qui médient la destruction des cellules β (Rabinovitch et coll. 1998, Mandrup-Poulsen et coll. 1990).

Plusieurs études ont démontré qu'il y a une augmentation soutenue de l'expression des gènes du TNF α au cours de l'inflammation de l'îlot (Held et coll. 1990, Mueller et coll. 1995). Les lymphocytes T CD4⁺, les macrophages et les CD participent à cette production constante de TNF α aux stades précoce et tardif de l'insulite (Dahlen et coll. 1998, Toyada et coll. 1994). Yang et coll. (1994) ont décrit le rôle majeur du TNF α dans l'initiation du DT1. En effet, ces auteurs ont montré qu'un traitement des souris NOD avec le TNF α accélère le DT1 et que toutes des souris traitées deviennent diabétiques. De plus, lorsque que les souris NOD sont traitées par injection i.p. d'un anticorps anti-TNF α , il y a une protection complète contre le DT1 (Yang et coll. 1994). Par la suite, Pakala et coll. (1999) ont généré des souris NOD déficientes pour le récepteur au TNF α (NOD.*SCID.TNF α R*^{-/-}) et ont montré que ces dernières sont protégées contre le DT1 après le transfert du clone T CD4⁺ BDC2.5 diabétogène. Cette protection s'explique par le fait que ce clone est incapable de provoquer l'inflammation initiale de l'îlot, puisque les cellules de l'îlot de la souris NOD.*SCID.TNF- α R*^{-/-} sont insensibles à l'apoptose induite par le TNF α (Pakala et coll. 1999). Des travaux récents ont démontré *in vitro* que le TNF α agit en synergie avec l'IFN γ pour favoriser l'induction de l'apoptose des cellules β (Lee et coll. 2004).

Tel qu'observé dans le cas du TNF α , la production d'IFN γ augmente avec la progression de l'insulite bénigne vers une insulite destructive (Suarez-Pinzon et coll. 1996). Cette production accrue d'IFN γ localisée dans l'îlot est assurée essentiellement

par les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Fox et coll. 1998, Suarez-Pinzon et coll. 1996, Anderson et coll. 1993). Cependant, la contribution de l' $IFN\gamma$ à la progression du DT1 semble secondaire, tel que montré par les études réalisées chez le modèle de souris NOD déficientes en $IFN\gamma$ (NOD. $IFN\gamma^{-/-}$). Chez ces souris, l'apparition du DT1 est retardée, par rapport au souris contrôles (Hultgren et coll. 1996). L'ensemble de ces résultats suggère que l' $IFN\gamma$ contribue indirectement à la destruction des cellules β , soit en accélérant l'activation des lymphocytes T effecteurs (Hultgren et coll. 1996) ou en augmentant l'apoptose des cellules β médiée par le $TNF\alpha$ (Lee et coll. 2004).

D'autres études ont montré une augmentation progressive de l'ARNm de l' $IL-1\alpha$ et $IL-1\beta$ dans les îlots des souris NOD pré-diabétiques jusqu'à l'apparition du diabète (Rabinovitch et coll. 1996, Anderson et coll. 1993). L'augmentation de l' $IL-1\alpha$ chez la souris NOD corrèle avec un accroissement de l'expression des niveaux d'ARNm de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS) et de radicaux libres NO (Rabinovitch et coll. 1996). Finalement, le traitement des souris NOD avec l' $IL-1\beta$ induit au niveau du pancréas une augmentation marquée de l'expression de iNOS par les macrophages activés et les cellules β (Reddy et coll. 1997). La production soutenue de radicaux libres NO par iNOS induit est cytotoxique pour les cellules β .

1.4.3. Implication des cellules présentatrices d'antigènes

Plusieurs observations indiquent que les cellules présentatrices d'antigènes (lymphocytes B, macrophages et CD) jouent un rôle majeur dans le développement du

DT1 chez la souris NOD. Il a été rapporté que les CD et de macrophages précèdent l'arrivée des lymphocytes T dans les îlots (Jansen et coll. 1994). L'accumulation de ces deux CPA est également observée chez la souris NOD.*SCID* (Dahlen et coll. 1998). Les lymphocytes B quant à eux infiltrant les îlots plus tardivement chez la souris NOD (Signore A et coll. 1989, Miyazaki A et coll. 1985).

1.4.3.1. Les lymphocytes B

Dans les stades tardifs de l'insulite, les lymphocytes B représentent 30% des cellules infiltrantes et sont localisés en périphérie de l'îlot (Rosmalen et coll. 2000, Signore et coll. 1989). La génération de souris NOD déficientes en lymphocytes B (NOD.*Igμ*^{-/-}) a permis de mettre en évidence l'implication des lymphocytes B dans le DT1. Chez ces souris, la péri-insulite est absente mais peut être reconstituée par le transfert de lymphocytes B de souris NOD (Akashi et coll. 1997). Finalement, Serreze et coll. (1998) ont montré que le rôle des lymphocytes B dans le développement DT1 est essentiellement de présenter les autoantigènes aux lymphocytes T autoréactifs. Ceci a été confirmé par Noorchashm et coll. (1999) qui ont montré que les souris NOD ayant des lymphocytes B déficients en CMH de classe II ne développent pas le DT1, car ceux-ci ne présentent pas les autoantigènes. Certes, il a été observé que les lymphocytes B produisaient des autoanticorps (ex: anti-acide glutamique décarboxylase), mais ceux-ci ne sont pas néfastes pour les cellules β.

1.4.3.2. Les macrophages

Lee et coll. (1988) ont montré que l'infiltration précoce des îlots est absente chez la souris NOD lorsqu'on inactive les macrophages par un traitement intrapéritonéal à la silice (la silice étant sélectivement toxique pour les macrophages). De façon similaire, Jun et coll. (1999) ont rapporté que la déplétion des macrophages chez la souris NOD empêche la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules T cytotoxiques spécifiques aux cellules β . La présence hâtive des macrophages à la périphérie de l'îlot favorise un micro-environnement propice à la différenciation des lymphocytes T en cellules cytotoxiques spécifiques aux cellules β (Jun et coll. 1999).

1.4.3.3. Les cellules dendritiques

Étant donné l'importance des CD dans ces travaux nous avons préféré consacrer une section spéciale (1.4.4) pour la description de ce type cellulaire.

1.4.4. La cellule dendritique (CD)

Les CD sont la pierre angulaire de l'évolution de la réponse immune. Ces CPA professionnelles semblent jouer un rôle critique dans l'autoimmunité en général et spécialement dans le DT1. La prochaine partie de ce mémoire sera consacrée à la description de ce type cellulaire ainsi qu'à son implication au niveau du diabète autoimmun.

1.4.4.1. Origine de la cellule dendritique

En 1973, Steinman et Cohn ont rapporté l'observation originale décrivant que parmi les cellules spléniques de souris, une population de cellules adhérentes possède une morphologie bien particulière, soit des pseudopodes de longueurs variables. Les auteurs ont alors introduit la terminologie cellules dendritiques (Fig. 2) (Steinman et coll. 1973, Steinman 1978). La particularité des CD, mise à part leur morphologie, est leur capacité de passer d'un stade de sentinelle immature à un stade de cellule immunostimulatrice mature capable de présenter des antigènes et d'activer les lymphocytes T. Ce phénomène est appelé maturation (Fig. 3) (Steinman 2003).

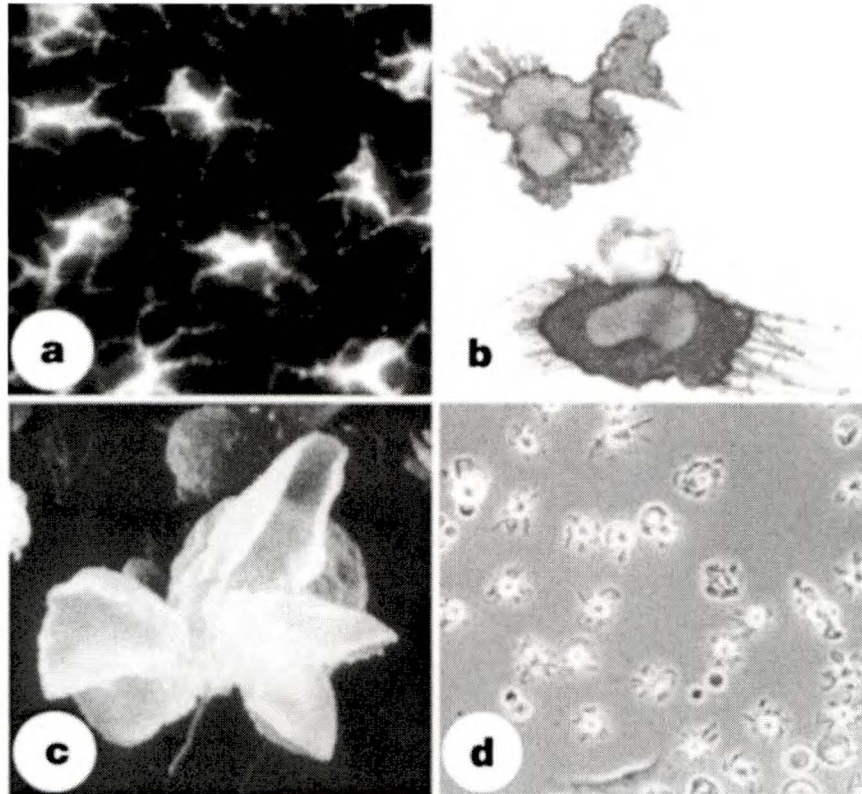


Figure 2. Morphologie des cellules dendritiques. **a**, CD de l'épiderme révélées par un anticorps anti-CMH II fluorescent; **b**, Marquage sur lamelle de type cytopins pour le CMH II de surface; **c**, CD vue en microscopie électronique; **d**, Culture de CD vues par microscopie en contraste de phase (adapté de Banchereau et Steinman coll. 1998).

Inducing Factors

Properties

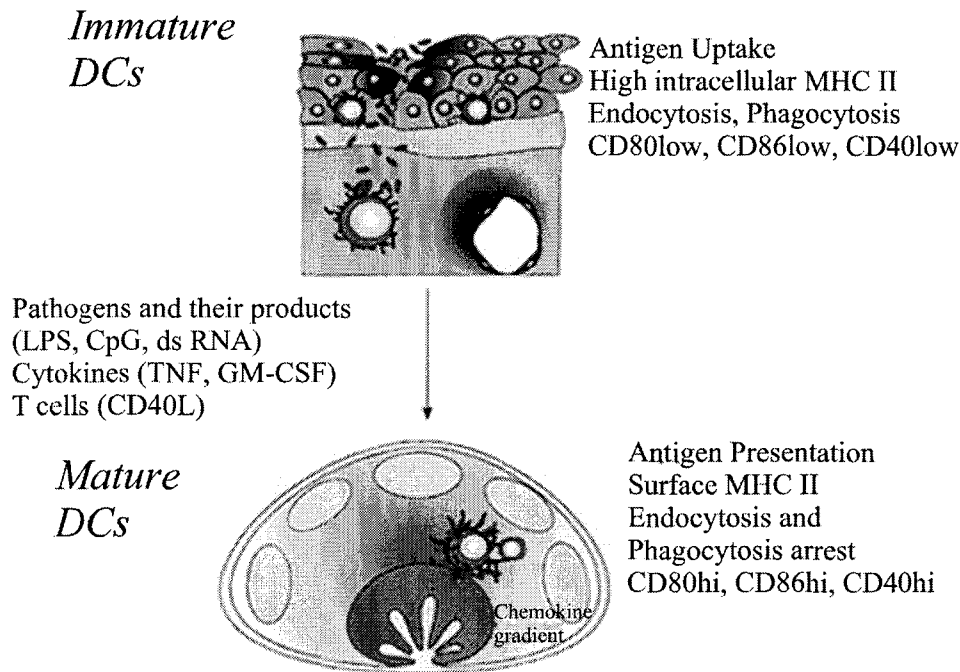


Figure 3. Étapes de maturation des CD. En présence de cytokines inflammatoires, de produits microbiens ou de lymphocytes T activés, les CD amorcent un processus de maturation: elles évoluent d'un mode sentinelles «capture d'antigènes» à un mode immunostimulatrices «activation des lymphocytes T». Les changements phénotypiques et fonctionnels associés à la maturation sont associés à leur migration dans les zones propres aux cellules T (paracortex) au niveau des organes lymphatiques périphériques (adapté de Fundamental Immunology, 5^{ième} édition, 2003).

La diversité phénotypique des CD chez l'homme et la souris est résumée dans le Tableau 2. Les CD ont comme origine les cellules souches hématopoïétiques. Ces dernières se différencient en progéniteurs myéloïdes communs (PMC) ($CD8\alpha^- CD11c^+ Cd11b^+$) et en progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) ($CD8\alpha^+ CD11c^+ Cd11b^{+/-}$) dans la moelle osseuse (Ardavin et coll. 2001, Liu et coll. 2001). Les PMC donnent naissance aux CD interstitielles et aux cellules de

Langerhans, lorsqu'elles migrent vers les tissus lymphoïdes ou épithéliaux (Bendris-Vermare et coll. 2001). Les PMC peuvent aussi donner naissance à deux autres types de précurseurs des CD, les monocytes et les cellules plasmacytoïdes, qui jouent un rôle important dans la réponse immune innée et adaptative (Manz et coll. 2001). Les PMC et les PLC se différencient en CD et mûrent en réponse à différents stimuli inflammatoires tel que des produits microbiens ou viraux (LPS, ARN double brin) et des cytokines inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF α et IFN α (Liu et coll. 2001).

1.4.4.2. Les cellules dendritiques; cellules sentinelles du système immunitaire

Les CD possèdent les caractéristiques nécessaires pour permettre l'induction de la réponse immune adaptative de manière efficace. Effectivement, la porte d'entrée des pathogènes est souvent au niveau des tissus périphériques, endroit où l'on ne retrouve pas les lymphocytes B et T spécifiques à l'antigène (Steinman 2003). La majorité (98%) des lymphocytes B et T sont localisés dans les organes lymphoïdes secondaires, site de leur activation (Zinkernagel et coll. 1997). Les CD font le lien entre l'entrée du pathogène et l'activation des lymphocytes. Elles patrouillent les différents tissus, en agissant en tant que sentinelles. Lorsqu'elles rencontrent un antigène exogène, elles le phagocytent et migrent au niveau de l'organe lymphoïde secondaire le plus proche tout en entamant un processus de maturation. Dans les ganglions, les CD présentent les antigènes aux lymphocytes T et B, les activent et permet leur différenciation en cellules effectrices (Ardavin 2003, Banchereau et Steinman 1998).

Tableau 2. Lignées des cellules dendritiques et leur phénotype chez la souris et l'homme

Caractéristiques	Souris	Homme
Phénotype commun	CMH classes I et II ^{low/high} , CD80 ^{low/high} , CD86 ^{low/high} , CD40 ^{low/high}	CMH classes I et II ^{low/high} , CD80 ^{low/high} , CD86 ^{low/high} , CD40 ^{low/high}
Cellules de Langerhans	CD11c ⁺ , granules de Birbeck ⁺ , E-cadherines ⁺ , Langerine ⁺ , DEC205 ⁺ , CD11b ⁺ , CD4 ⁺ (sous-type), CD8α ⁻ , 33D1 ⁻ (sous-type)	CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , CD13 ⁺ , CD33 ⁺ , CD4 ⁺ , CD1a ⁺ , granules de Birbeck ⁺ , Langerin ⁺ , DC-LAMP ⁺ , IL-3R ^{+/-}
Cellules dendritiques interstitielles	CD11c ⁺ , granules de Birbeck ⁻ , E-cadherines ⁻ , Langerine ⁻ , DEC205 ⁺ (sous-type), CD11b ⁺ (sous-type), CD8α ⁺ (sous-type)	CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , CD13 ⁺ , CD33 ⁺ , CD4 ⁺ , CD1a ⁻ , granule de Birbeck ⁻ , DC-LAMP ⁺ , IL-3R ⁻
Cellules dendritiques dérivées des monocytes		
Productrices de cytokines <i>in vitro</i>	CD11c ⁺ , CD54 ⁺ , DEC-205 ⁺ , CD4 ⁺	CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , CD1 ⁺ , CD13 ⁺ , CD33 ⁺ , CD44 ⁺ , ICAM-1 ⁺ , CD14 ⁻
Migration transendothéliale <i>in vitro</i>		CD14 ⁻ , CD32 ⁻ , CD64 ⁻ , CD11b ⁻ , CD83 ^{+/-} , CD1a ⁻
Migration transendothéliale <i>in vivo</i>	CD11c ^{low} , MIDC8 ⁺ , 2A1 ⁺ , DEC-205 ⁺ (sous population), B220 ⁻ , CD8α ⁻	
Cellules dendritiques plasmacytoïdes	CD11c ^{low} , CD8α ⁺ (fraction), CD11b ⁻ , Ly6C/Gr1 ⁺ , B220 ⁺ , CD54 ⁺ , DEC205 ^{low}	CD11c ⁻ , IL-3R ⁺ , CD11b ⁻ , CD4 ⁺ , CD1a ⁻ , CD13 ⁻ , CD33 ⁻ , DC-Lamp ⁺

MHC, complexe majeur d'histocompatibilité.

(adapté de Fundamental Immunology, 5^{ème} édition, 2003)

1.4.4.3. Processus migratoire des cellules dendritiques

La migration des CD vers les ganglions lymphatiques est essentielle à la présentation initiale des antigènes aux lymphocytes T pour l'induction de la réponse immune. Les principales chémokines et récepteurs impliqués dans la migration des CD vers les ganglions ont été identifiés. Il a été montré, par exemple, que le récepteur CCR2 était essentiel à la migration des cellules de Langerhans et des CD spléniques vers les ganglions lymphatiques (Gunn et coll. 1999). Deux autres chémokines servent à l'adhésion des CD dans le compartiment des lymphocytes situé au niveau des ganglions lymphatiques: la SLC/CCL21 (*secondary lymphoid tissue chemokine*) et MIP-3 β /CCL19 (*macrophage inflammatory chemokine-3 β*) (Martin-Fontecha et coll. 2003). Ces deux chémokines possèdent une structure similaire et se lient au même récepteur, le CCR7 (Randolph 2001). En fait, les CD immatures expriment le récepteur CCR6 et suivent un gradient induit par la chémokine MIP-3 α . Lors de leur maturation, les CD régulent à la baisse le récepteur CCR6 et augmentent l'expression de surface du récepteur CCR7 (Dieu et coll. 1998). La régulation à la hausse de CCR7 permet aux CD de suivre un gradient chimotactique induit par MIP-3 β . Les CD se dirigent ainsi vers les ganglions où sont localisés les lymphocytes (Iwasaki et coll. 2000, Dieu et coll. 1998). Dans les ganglions lymphatiques, les CD matures sécrètent du MIP3- β provoquant ainsi un recrutement additionnel de CD matures ce qui contribue à générer une boucle soutenue d'activation des lymphocytes T (Sallusto et coll. 1998).

1.4.4.4. Processus d'activation des lymphocytes par les cellules dendritiques

Dans le ganglion lymphatique, la présentation d'un antigène via le CMH I ou CMH II par les CD matures permet l'activation des lymphocytes T spécifiques à cet antigène (Miller et coll. 2004, Bousso et coll. 2003). L'activation des lymphocytes T nécessite l'interaction des molécules de costimulation exprimées chez les CD (CD40, CD80 et CD86) avec leurs ligands respectifs (CD40L, CD28 et CTLA-4) exprimés chez les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Banchereau et Stienman 1998). De manière intéressante, la maturation des CD est associée avec l'expression de surface des molécules de costimulation qui sont normalement faiblement exprimées chez les CD immatures (Inaba et coll. 1994, Larsen et coll. 1992). La liaison de CD28 avec CD80 et CD86 induit l'activation et l'expansion clonale des lymphocytes T ainsi que l'expression de CTLA-4. La régulation négative de cette activation est induite par la liaison de CTLA-4 aux mêmes récepteurs (CD80, CD86), grâce une plus grande affinité de CTLA-4 pour ceux-ci (Sansom et coll. 2003).

1.4.4.5. Les cellules dendritiques et le DT1

Des études récentes suggèrent que la présentation initiale des premiers autoantigènes provenant de l'îlot aux lymphocytes T autoréactifs se fait par les CD présentes dans l'infiltrat inflammatoire précoce (Homo-Delarche et coll. 2004, Steinman 2003, Mathis et coll. 2001).

Plusieurs études ont montré l'existence d'un développement anormal des CD chez les patients atteints du DT1 (Peng et coll. 2003, Zacher et coll. 2002) ainsi que chez la souris NOD (Nikolic et coll. 2004, Vasquez et coll. 2004, Morin et coll. 2003). Chez la souris NOD, il a été montré *in vitro* qu'il y a un dérèglement du développement des CD provenant des progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse (Nikolic et coll. 2004, Vasquez et coll. 2004). En effet, la quantité de CD immatures générées *in vitro* par traitement au GM-CSF est inférieure à celle des souris témoins. Ces CD expriment faiblement le CMH II et les molécules de costimulation et ont une faible capacité d'activation des lymphocytes T comparativement aux CD générées des souches de souris résistantes au DT1 (BALB/c et C57BL/6) (Strid coll. 2001). Par contre, si les CD provenant de souris NOD sont générées *in vitro* avec une combinaison de GM-CSF et d'IL-4, elles possèdent alors une plus grande capacité de maturation, elles expriment plus fortement les molécules de costimulation et elles activent davantage les lymphocytes T comparativement aux CD dérivées des souches de souris résistantes au DT1 (BALB/c et C57BL/6) (Marleau et coll. 2002, Steptoe et coll. 2002).

À l'inverse, d'autres études ont montré que les CD générées à partir de précurseurs de la moelle osseuse mises en présence de GM-CSF et d'IL-4 (bien que plus stimulatrices *in vitro* (Steptoe et coll. 2002)) protègent ou retardent le développement du DT1. Ceci a été mis en évidence par des expériences dans lesquelles l'injection des CD, provenant de la moelle osseuse et générées suite à un traitement au GM-CSF et à l'IL-4, à des souris NOD pré-diabétiques protègent contre

la maladie en favorisant une réponse immunitaire de type Th2 (Feili-Hariri et coll. 1999). Une autre étude a montré que l'injection de CD isolées des ganglions pancréatiques de souris NOD induisait un retard dans l'apparition du DT1 chez les souris NOD pré-diabétiques (Clare-Salzler et coll. 1992). Ces études démontrent clairement que les CD peuvent contribuer à la tolérance périphérique chez la souris NOD, malgré le fait que ces cellules jouent aussi un rôle critique dans le processus d'activation des lymphocytes T autoréactifs et dans l'inflammation des îlots.

1.4.5. Mécanismes de tolérance

1.4.5.1. Cellules dendritiques immatures et/ou tolérogènes

Les CD jouent un rôle important dans la tolérance périphérique des lymphocytes T (Kleindienst et coll. 2005, Probst et coll. 2005, Chilton et coll. 2004, Goldschneider et coll. 2003). Plusieurs types de CD tolérogènes ont été décrits. Parmi ceux-ci, il y a les CD générées à partir de précurseurs de la moelle osseuse avec une combinaison d'IL-10, de TNF α et de GM-CSF, qui se différencient en cellules ayant une morphologie plasmacytoïde (CD11c^{low}CD45Rb^{high}) (Wakkach et coll. 2003). Les CD générées de précurseurs de la moelle osseuse suite à un traitement avec de faibles doses de GM-CSF sont aussi de type tolérogène (Lutz et coll. 2000). *In vivo*, l'existence de cellules dendritiques tolérogènes ayant un phénotype semblable aux CD plasmacytoïdes (CD11c⁺, B220⁺, Gr-1⁺, CD11b⁻, CMH II^{low}) a été mise en évidence. Celles-ci induisent la tolérance dans un modèle d'inflammation allergique grâce à leur faible capacité de stimulation des lymphocytes T CD4⁺ (Oriss TB et coll. 2005). Des

CD ayant un phénotype semi mature présentant l'antigène MOG sont capables d'induire une protection contre l'encéphalomyélite auto-immune dans un modèle murin (Kleindienst et coll. 2005). La caractéristique principale des CD tolérogènes est une expression faible des molécules de costimulation (état immature ou semi mature) et une capacité réduite d'activation des lymphocytes T (Steinman et coll. 2003).

1.4.5.2. Mécanismes moléculaires d'induction de la tolérance par les cellules dendritiques

Les mécanismes moléculaires permettant la tolérance par les CD demeurent encore méconnus. *In vivo*, des expériences ont révélé que les CD peuvent induire la tolérance des lymphocytes CD8⁺ (Probst et coll. 2003) via la voie de liaison directe entre les molécules de costimulation CD80/CD86 et le ligand CTLA-4 (Probst et coll. 2005). Les CD peuvent, *in vivo*, empêcher l'activation de lymphocytes de type Th1 (Hawiger et coll. 2001) et induire l'expansion de lymphocytes qui produisent de l'IL-10 et/ou du TGFβ (lymphocytes T de type Tr1), capables de bloquer l'activation des cellules T effectrices (Oldenhove et coll. 2003, Vasu et coll. 2003, Wakkach et coll. 2003). De plus, Jonuleit et coll. (2000) ont rapporté qu'*in vitro* les CD ayant un phénotype immature peuvent induire la différenciation des lymphocytes T en cellules T suppressives (Tr1) productrices d'IL-10. L'IL-10 est connue pour ses effets immunosuppresseurs qui contribuent à la tolérance périphérique (Grutz 2005). Finalement, les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ régulateurs activés par les CD tolérogènes (Guiducci et coll. 2005, Karez et coll. 2005, Fehervari et coll. 2004) peuvent eux-mêmes empêcher la maturation des cellules dendritiques *in vitro* et *in vivo* (Serra et

coll. 2003). Ces CD restent donc dans un état immature, une situation qui est favorable à l'induction de la tolérance périphérique dans un contexte non inflammatoire. (Misra et coll. 2004, Serra et coll. 2003).

1.5. Le GM-CSF et l'inflammation

Le GM-CSF, principale cytokine permettant la génération des CD à partir de la moelle osseuse, est essentiel à l'expansion des CD immatures aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Hamilton et coll. 2004). Le rôle physiologique du GM-CSF a été mis en évidence dans plusieurs modèles d'inflammation et d'auto-immunité (Hamilton 2002). L'administration de GM-CSF accélère et aggrave l'arthrite rhumatoïde induite au collagène (AIC). D'autres études ont montré que l'expression transgénique locale du GM-CSF dans les cellules pariétales de l'estomac est suffisante pour induire la gastrite auto-immune (Biondo et coll. 2001). De plus, dans un modèle murin d'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) les souris développent l'EAE de façon beaucoup plus sévère si les lymphocytes T possèdent un transgène codant pour le GM-CSF (Marusic et coll. 2002). À l'inverse, les souris déficientes en GM-CSF ont une susceptibilité diminuée à l'AIC (Campbell et coll. 1998, Bischof et coll. 2000) et elles sont résistantes à l'EAE (McQualter et coll. 2001). Ces résultats indiquent que le GM-CSF joue un rôle important dans l'induction de l'inflammation et le développement de l'auto-immunité. Ce rôle potentiel du GM-CSF de promouvoir l'auto-immunité a été récemment remis en question. Plusieurs travaux ont rapporté que l'administration de GM-CSF prévient ou réduit significativement la thyroïdite auto-immune

expérimentale (TAE) en favorisant la génération de CD semi matures qui sont impliquées dans l'activation des lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ régulateurs (Gangi E et coll. 2005, Vasu et coll. 2003). D'autre part, une expression par transgénèse du GM-CSF au niveau des cellules β entraîne une infiltration massive de cellules mononuclées, composée principalement de macrophages et de CD (Krakowski et coll. 2002). Ces souris transgéniques sont résistantes au diabète induit par la streptozotocine, comparativement aux souris témoin (non transgéniques) (Krakowski et coll. 2002). Ces résultats suggèrent que l'expression exogène locale du GM-CSF protège les îlots en favorisant le recrutement et l'expansion d'une population de CD tolérogènes incapables d'activer les lymphocytes T. Par conséquent, il serait intéressant de pouvoir moduler *in vivo* les CD avec le GM-CSF afin de les maintenir dans un état immature ou tolérogène et ainsi induire chez la souris NOD la protection contre le DT1.

2. Hypothèse de travail

La modulation *in vivo* des CD par le GM-CSF favorise la génération de CD résistantes à la maturation, permettant ainsi la tolérance périphérique et la protection contre le diabète de type 1.

3. Objectifs

Objectif #1. Étudier l'effet du GM-CSF *in vivo* sur les CD chez la souris NOD et analyser l'impact sur le développement du DT1.

Objectif #2. Élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la modulation du DT1 par le GM-CSF chez la souris NOD.

4. Matériel et méthodes

4.1. Animaux et traitements

Les souris NOD, NOD.*SCID* femelles ont été achetées des laboratoires Jackson (Bar Harbor, ME). Les souris 8.3-NOD ont été obtenues du laboratoire du Dr Pere Santamaria (Université de Calgary, Verdaguer et coll., 1997). Toutes les souris ont été maintenues dans un environnement stérile à l'animalerie de la faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke. Les traitements au GM-CSF ont été effectués en utilisant le protocole suivant: les souris femelles pré-diabétiques de 3 à 4 semaines ont été traitées 3 fois par semaine par injection i.p. avec 100 ng de GM-CSF (R&D systems, Minneapolis, MN) pour les trois premières semaines et, par la suite, 2 fois par semaines par injection i.p. avec 100 ng de GM-CSF jusqu'à 40 semaines d'âge.

4.2. Évaluation du diabète

La détection du diabète chez les souris NOD a été faite en mesurant la glycosurie au moyen de bandelettes réactives Uristix (Bayer) et confirmée par mesure de la glycémie avec un glucomètre Advantage Accu-Check (Roche Diagnostics, Allemagne). Les souris ont été considérées diabétiques après deux réactions positives sur la bandelette Uristix et quand la concentration de glucose sanguin était supérieure à 14 mM.

4.3. Lignées cellulaires et anticorps

Les anticorps anti-CD8 α -PE, anti-CD4-FITC/ biotine, anti-CD25-FITC, anti-CD62L-PE, anti-CD11b-FITC, anti-CD45Rb-PE, anti-CD11c-FITC/ biotine, anti-B71-biotine, anti-B72-biotine, anti-V β 8- FITC et anti-I-Ak/g7 ont été achetés chez Becton-Dickinson (San Jose, CA). L'hybridome 145-2C11 produisant l'anticorps anti-CD3 a été obtenu du laboratoire du Dr Pere Santamaria (Université de Calgary). Les analyses cytofluorimétriques ont été faites en utilisant un cytomètre en flux (FACS) de type FACS Calibur (Becton Dickinson, San Diego, CA) et les données analysées avec le programme Cell Quest Pro (Becton Dickinson, CA).

4.4. Histopathologie

Les pancréas ont été fixés par traitement à la formaline (Fisher Scientific, Montréal), et enrobés de paraffine. Les blocs de tissus ont été sectionnés et colorés à l'hématoxyline et l'éosine. Le degré d'insulite (inflammation) a été évalué par microscopie optique de 10 à 15 îlots par souris et est défini selon les critères suivants: 0, îlots normaux; 1, péri-insulite; 2, infiltration de cellules mononuclées dans 25% des îlots; 3, infiltration de cellules mononuclées dans 25%-50% des îlots; 4, >50% des îlots infiltrés.

4.5. Peptides

Le peptide NRP-A7 qui est reconnu spécifiquement par le TCR du lymphocyte T 8.3-CD8⁺ et le peptide TUM témoin ont été obtenus du Dr C. Servis (Université de Lausanne). Les peptides ont été synthétisés en phase solide en utilisant la stratégie de protection Fmoc et purifiés par HPLC en phase inverse. L'homogénéité des peptides (>90%) a été confirmée par spectrométrie de masse.

4.6. Génération des CD de la moelle osseuse et isolement des CD de la rate

Les CD ont été générées tel que décrit par Lutz et coll. (1999). Brièvement, les cellules de la moelle osseuse provenant des fémurs et des tibias des souris ont été cultivées dans un milieu complet (RPMI 1640, FBS 10%, 5 µM 2-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO), 100 U/ml pénicilline (Gibco, CA), 100 µg/ml streptomycine (Gibco, CA)) contenant du GM-CSF (5 ng/ml) avec ou sans IL-4 (4.5 ng/ml) pendant 7 jours. Les CD de la rate ont été purifiées au moyen du système de billes magnétiques MACS (Miltenyi Biotec, Cologne, Allemagne). Pour ce faire les rates ont été préalablement digérées avec de la collagénase D (Roche Diagnostics), tel que décrit par le protocole de la compagnie. Par la suite, les cellules ont été incubées avec des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD11c, puis exposées à un champ magnétique sur une colonne de purification fournie par la compagnie. La pureté des CD de la rate a été vérifiée par FACS et était dans tous les cas supérieure à

85%. Dans certaines expériences les CD ont été stimulées pendant 24 à 48 h avec du LPS (Sigma-Aldrich; 1 µg/ml) avant d'être utilisées.

4.7. Essais d'activation et de prolifération cellulaire

Les CPA (1×10^5 cellules/puits) ou les CD purifiées (1×10^4 cellules/puits) irradiés provenant de la rate des souris traitées au GM-CSF ou au PBS ont été pulsées avec le peptide NRP-A7 ou avec le peptide témoin TUM (1 µg/ml). Par la suite, des lymphocytes T 8.3-CD8⁺ purs naïfs (2×10^4 cellules/puits) ont été ajoutés à la co-culture et les cellules ont été distribuées dans une plaque de culture 96 puits placées à l'incubateur pendant 72 h à 37°C. Après 48 h de co-culture, les surnageants ont été récoltés pour un dosage des cytokines l'IL-2 et IFN γ par ELISA en utilisant une trousse commerciale (R&D Systems, Minneapolis, MN). Pendant les dernières 24 heures, les cultures cellulaires ont été pulsées avec de la [³H]-thymidine (1 µCi/puits) afin de mesurer la prolifération des lymphocytes T 8.3-CD8⁺.

4.8. Essais de prolifération du clone T 8.3-CD8⁺ en présence des lymphocytes T CD4⁺

Les différentes sous populations de lymphocytes T CD4⁺ (CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁻) provenant des souris traitées au GM-CSF ou témoins ont été ajoutées aux co-cultures décrites en 4.7, afin de vérifier leur pouvoir d'activation ou d'inhibition de la prolifération du clone diabétogène T 8.3-CD8⁺. Les cellules ont été pré-activées pendant 24 à 72 h en les cultivant en présence d'IL-2 (10 U/ml) dans des

plaques de culture de 96 puits tapissés de l'anticorps anti-CD3 (5 µg/ml). Ces lymphocytes T CD4⁺ ont été purifiés par le système MACS. Brièvement, les splénocytes totaux ont été incubés 15 min à 4°C avec un cocktail d'anticorps couplés à des billes magnétiques anti-CD8 (Ly-2), anti-CD11b (Mac-1), anti-CD45R (B220), anti-CD49b (DX5) et anti-Ter-119. Les cellules couplées à ces anticorps ont été retenues dans un champ magnétique (système MACS) afin d'enrichir les lymphocytes T CD4⁺ par sélection négative. Ces lymphocytes T CD4⁺ purs ont ensuite été incubés 15 min à 4°C avec un anticorps anti-CD25-PE, lavés et réincubés avec un anticorps anti-PE couplé à des billes magnétiques. Cette dernière étape a permis la sélection positive des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ grâce au système MACS. La pureté des cellules T CD4⁺CD25⁺ et T CD4⁺CD25⁻ a été confirmée par FACS et était toujours supérieure à 85%.

4.9. Production de cytokines par les lymphocytes T

Les cellules de la rate totale ou purifiées par le système MACS (lymphocytes T CD4⁺ totaux, CD4⁺CD25⁻ ou CD4⁺CD25⁺, voir section 4.8) provenant des souris traitées au GM-CSF ou témoins (1 x 10⁵ cellules/puits) ont été stimulées avec un anticorps anti-CD3 (5 µg/ml) en présence ou non d'IL-2 10 U/ml (Roche) pour différents temps compris entre 24 h et 72 h à 37°C dans un milieu de culture RPMI complet. Les surnageants ont été récoltés et l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 et l'IFN γ ont été dosés par tests ELISA selon le protocole du fournisseur (R&D Systems).

4.10. Transferts adoptifs chez des souris receveuses NOD.*SCID*

Les cellules de la rate des souris traitées au GM-CSF ou témoins (PBS) ont été injectées dans la veine de la queue de souris receveuses NOD.*SCID* âgées de 6 à 10 semaines. Brièvement, les cellules ont été préparées à partir de la rate en écrasant celle-ci entre deux lamelles de verre rugueux stériles. La suspension cellulaire a été incubée dans un tampon d'hémolyse (17 mM Tris-HCl, 140 mM NH₄Cl, pH 7.2, 2 min à la température de la pièce). Après avoir lavé les cellules avec du PBS, elles ont été resuspendues à une densité de 40×10^6 cellules/ml pour pouvoir injecter 200 µl de cellules, soit 8×10^6 cellules par souris. Dans certaines expériences, les CD ont été éliminées des préparations cellulaires à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD11c, en suivant le protocole fourni par la compagnie (Miltenyi Biotec). Le développement du diabète des souris receveuses a été suivi en mesurant la glycosurie.

4.11. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés et comparés selon la méthode Mann-Whitney avec l'aide du logiciel de statistiques Prism 4.1 (Graphpad Software, San Diego, CA).

5. Résultats

5.1. Génération de CD tolérogènes ayant un phénotype immature *in vitro*

Lutz et coll. (2000) ont montré que les CD générées à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris BALB/c ont un phénotype immature et tolérogène lorsqu'on cultive ces précurseurs, avec de faibles quantités de GM-CSF (CD^{imm}). Ces auteurs ont aussi observé qu'il est possible de générer des CD ayant un fort pouvoir activateur des lymphocytes T CD8⁺ lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu contenant de l'IL-4 et du GM-CSF. Afin de vérifier s'il est possible d'obtenir des CD ayant un phénotype tolérogène *in vitro* chez la souris NOD, nous avons généré des CD^{imm} en les cultivant en présence d'une faible concentration de GM-CSF (5 ng/ml) mais en absence d'IL-4. Ces CD présentent une faible expression de surface de molécules de costimulation CD80 et CD86 ainsi qu'une faible expression du CMH II et de CD40 comparativement au CD témoins (CD^{mat}) générées avec le GM-CSF (5 ng/ml) et l'IL-4 (4.5 ng/ml) (Fig. 4A et Fig. 4B, lignes continues). La stimulation au LPS (1 µg/ml), n'induit pas la maturation des CD^{imm}, en comparaison des CD^{mat} (Fig. 4A et Fig. 4B, lignes foncées). Nous avons ensuite comparé la capacité d'activation du clone diabétogène T 8.3-CD8⁺ par les CD^{imm} et CD^{mat} générées dans un essai de présentation du mimotope NRP-A7 par ces CD (Amrani et coll. 2000).

La capacité d'activation et de prolifération du clone T 8.3-CD8⁺ par les CD^{imm} est réduite d'environ 10 fois par rapport aux CD^{mat}. Ces expériences confirment qu'il est possible de générer des cellules dendritiques tolérogènes autant chez la souris NOD que chez la souris BALB/c (Fig. 4C).

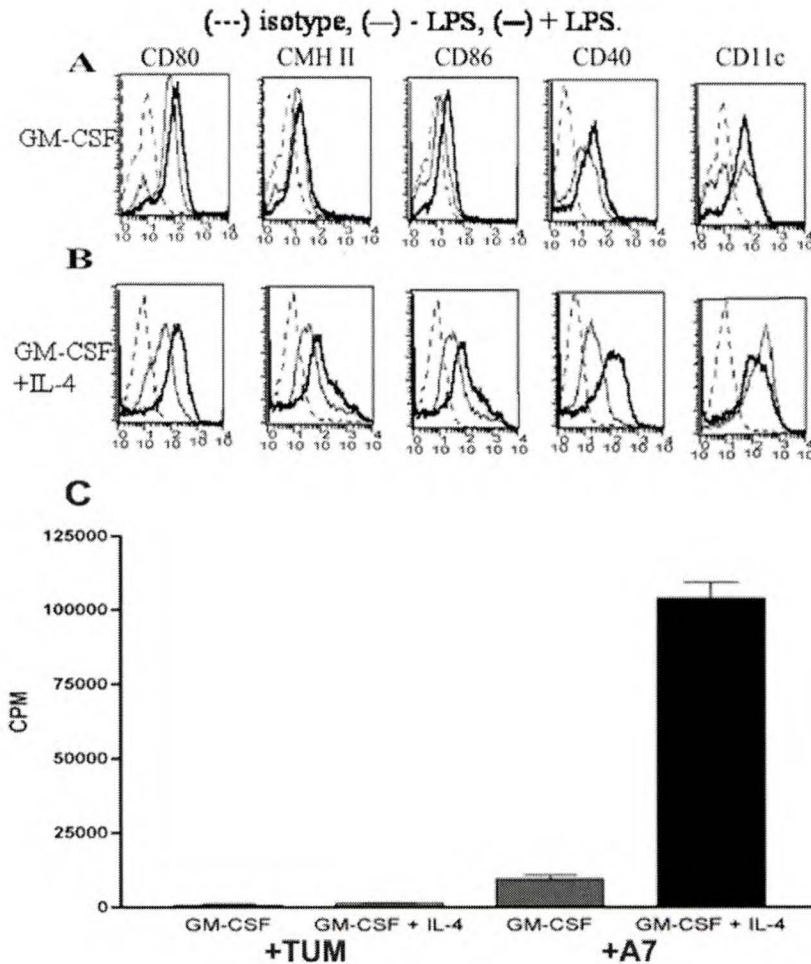


Figure 4. Analyse phénotypique et fonctionnelle des CD générées à partir de précurseurs de la moelle osseuse chez la souris NOD. Les cellules de la moelle osseuse ont été cultivées pendant 7 jours avec du GM-CSF (5 ng/ml) avec ou sans IL-4 (4.5 ng/ml). Les cellules ont été ensuite exposées durant les 24 dernières h de culture à du LPS (1 ug/ml). A) et B) Comparaison du degré de maturation des CD^{imm} et des CD^{mat} suite à une stimulation au LPS. C) Comparaison de leur capacité de stimulation du clone T 8.3-CD8⁺ diabétogène via la présentation du peptide NRP-A7 (1 µg/ml) par incorporation de [³H] thymidine.

Sachant que les CD^{imm} peuvent induire la tolérance, nous avons vérifié s'il était possible de générer, par injection de faibles doses de GM-CSF, des CD^{imm} chez la souris NOD, ce qui induirait une protection contre le DT1.

5.2. Le traitement des souris NOD pré-diabétiques avec le GM-CSF protège contre le diabète

Afin de vérifier si le GM-CSF peut agir comme immunorégulateur contrôlant l'inflammation des îlots et la destruction des cellules β *in vivo*, des souris NOD âgées de 3 semaines (l'insulite n'est pas encore apparue à cet âge) ont reçu par injection i.p. du GM-CSF à faible dose (100 ng/injection) trois fois par semaines pour les trois premières semaines et par la suite, deux fois par semaines jusqu'à 32 semaines (les souris témoins ont reçu seulement le PBS). À 32 semaines, 23% des souris NOD traitées au GM-CSF ont développé le diabète (n = 20) alors que 85% des souris témoins sont devenues diabétiques (n = 24) (Figure 5). Les taux de glycémie des souris traitées au GM-CSF est de 7.14 ± 1.32 mM. Les souris NOD diabétiques traitées au PBS présentent un taux de glycémie supérieur à 14 mM. Ces résultats indiquent clairement que le traitement de souris NOD pré-diabétique avec de faibles doses de GM-CSF (100 ng/ml) protège contre le diabète.

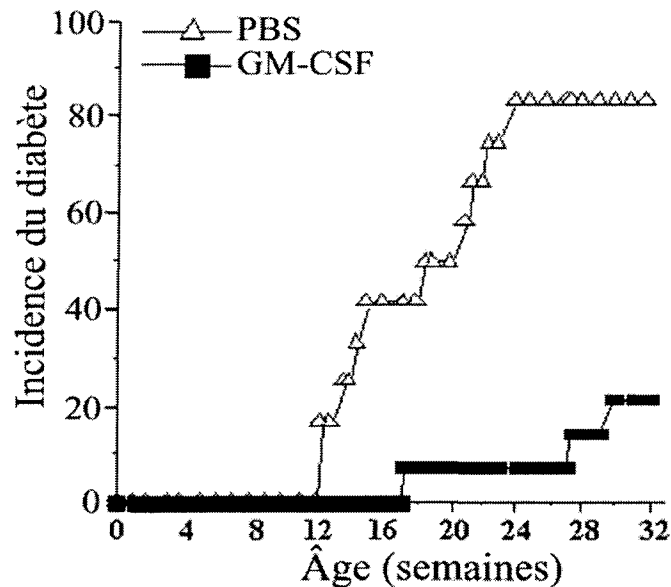


Figure 5. Incidence du diabète chez les souris NOD femelles traitées par injection i.p. de PBS (triangles) (n = 20) et GM-CSF (carrés) (n = 24). Les souris sont considérées comme étant diabétiques lorsqu'elles sont testées positives pour la glycosurie et lorsqu'elles ont une glycémie supérieure à 14 mM.

Dans le but de vérifier si la protection contre le DT1 induite par le GM-CSF est associée à un changement au niveau de l'inflammation des îlots, des coupes histologiques du pancréas ont été effectuées chez les souris âgées de 8, 12 et 32 semaines. L'analyse des coupes a révélé qu'il y a très peu d'inflammation des îlots de Langerhans (Fig. 6B).

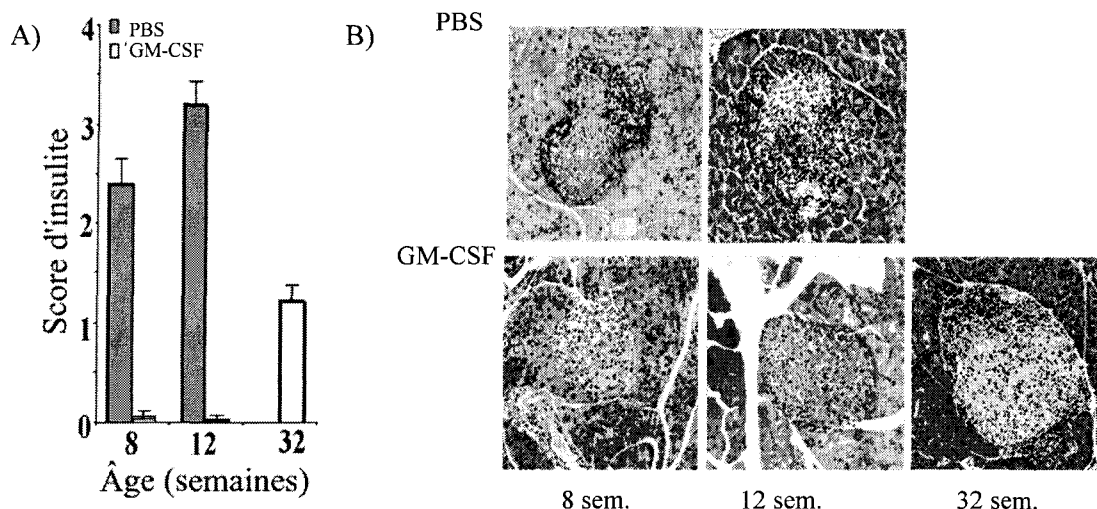


Figure 6. Le GM-CSF atténue la progression de l'insulite. Progression de l'insulite à 8, 12 et 32 semaines d'âge des souris NOD traitées au GM-CSF ou au PBS (témoins). A) Score d'insulite: 0= îlot non infiltré, 1= péri-insulite, 2= îlot infiltré à < de 25%, 3= îlot infiltré entre 25 et 50%, 4= îlot infiltré à > 50%. B) Histologie représentative des îlots pancréatiques de souris NOD traitées au PBS ou au GM-CSF. Les coupes de pancréas ont été colorées à l'hématoxyline et éosine (grossissement 100X).

Il n'y a aucune infiltration significative des îlots chez les souris NOD traitées au GM-CSF âgées de 8 et 12 semaines (score de 0) (Fig. 6A). À 32 semaines l'infiltration est à moins de 25% (score de 1) (Fig. 6A). Chez les souris témoins, il y a une infiltration importante des îlots dès la 8^{ème} semaine, puis l'infiltration est massive à 12 semaines (score = 3-4, 50% des îlots infiltrés). À 32 semaines les îlots des souris témoins sont complètement détruits.

5.3. Le traitement au GM-CSF augmente la quantité de CD chez la souris NOD

Sachant que le GM-CSF est un facteur de croissance important pour développement des CD, nous avons déterminé si le traitement au GM-CSF induit des changements quantitatifs au niveau des CD chez les souris NOD. Bien que le traitement n'affecte pas la quantité de splénocytes totaux (Fig. 7A), nous avons noté une augmentation significative du nombre de CD isolées chez les souris traitées au GM-CSF âgées de plus de 32 semaines par rapport aux souris témoins. Le pourcentage de CD isolées de la rate des souris traitées au GM-CSF est de 2.42% comparativement à 1.71% chez les souris NOD traitées au PBS (Fig. 7B).

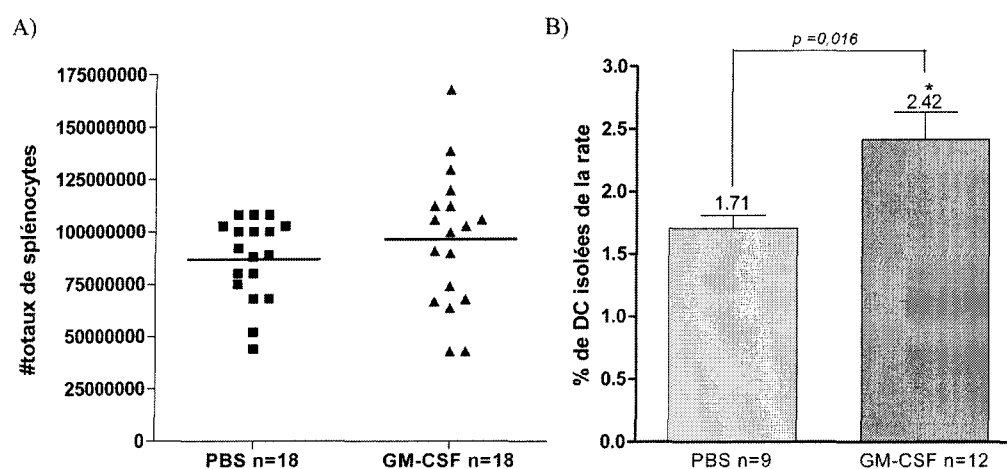


Figure 7. Pourcentage de CD isolées de souris traitées au GM-CSF (de plus de 32 semaines d'âge) ou de souris traitées au PBS par rapport à la quantité de cellules totales retrouvées dans la rate.

5.4. Le traitement au GM-CSF induit une augmentation de CD CD11c^{hi}CD45RB^{low}

Nous avons comparé les sous populations de CD retrouvées chez les souris traitées au GM-CSF par rapport à celles retrouvées chez les souris témoins. Ces expériences sont nécessaires afin de vérifier si le traitement au GM-CSF favorise la génération de CD tolérogènes tel que décrit par différents groupes (Oriss et coll. 2005, Wakkach et coll. 2003, Lutz et coll 2000). Le traitement au GM-CSF ne semble pas influencer un changement dans les populations de CD CD11c⁺CD8a⁺ ou de CD de type myéloïde CD11c⁺CD11b⁺ (Fig. 8A et Fig. 8B). Le seul changement significatif observé au niveau des sous populations de CD a été chez les CD CD11c^{hi} CD45RB^{low}. En effet, les résultats indiquent que le pourcentage de CD de cette sous population passe de 45% chez les souris témoins à plus de 53% ($p=0.05$) chez les souris traitées au GM-CSF (Fig. 8C).

5.5. Les CD des souris traitées au GM-CSF ont un phénotype de CD^{imm}

Nous avons par la suite vérifié si les CD des souris traitées au GM-CSF résistent à la maturation induite par le LPS tel qu'observé *in vitro* chez les CD générées avec une faible dose de GM-CSF à partir de précurseurs de la moelle osseuse.

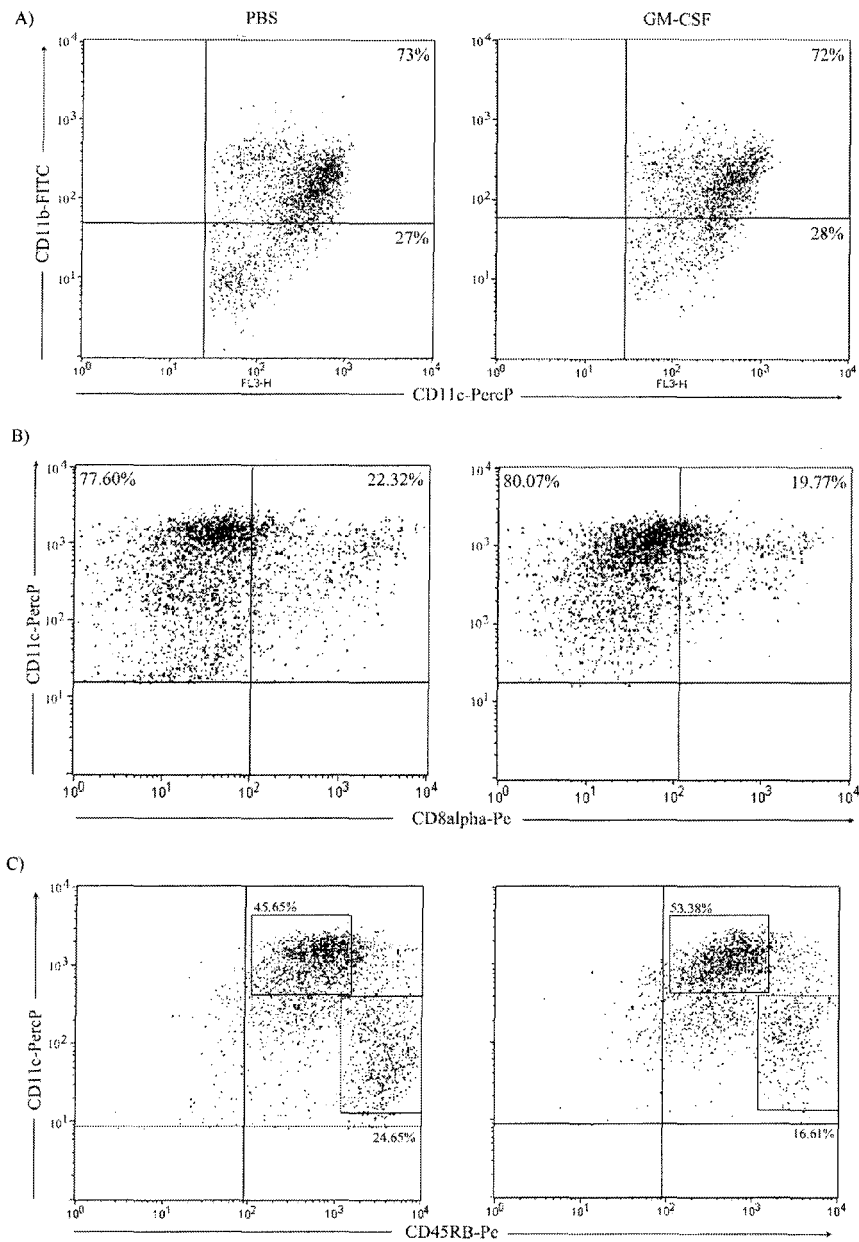


Figure 8. Phénotype des CD provenant de la rate des souris traitées au GM-CSF par rapport aux souris témoins traitées au PBS. Les CD ont été purifiées de la rate et ont ensuite été marquées avec une combinaison d'anticorps anti-CD11c/anti-CD11b A), anti-CD11c/anti-CD8 α B) ou anti-CD11c/anti-CD45RB C) puis analysées par FACS. Chaque cadrant est représentatif de l'analyse des CD d'au moins deux souris par groupes.

Nous avons donc purifié les CD des souris traitées au GM-CSF ou au PBS et nous les avons stimulées pendant 48 h avec du LPS (1 µg/ml). L'analyse des CD par FACS a démontré que l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 et de la molécule CD40 est augmentée après stimulation au LPS chez les CD des souris témoins, une caractéristique des CD^{mat} (Fig. 9A). Cette induction à la hausse n'est pas observée chez les CD isolées des souris NOD traitées au GM-CSF. Ce résultat indique que le traitement au GM-CSF induit une population de CD résistantes à la maturation au LPS, caractéristique des CD tolérogènes (Lutz et coll. 2000).

5.6. Les CD des souris traitées au GM-CSF ont une moins grande capacité d'activation du clone T 8.3-CD8⁺

Dans le but d'étudier l'impact du traitement au GM-CSF sur le potentiel des CPA de la rate à induire la prolifération et l'activation de lymphocytes T autoréactifs, nous avons comparé la capacité des cellules de la rate de souris traitées au GM-CSF et au PBS à induire la prolifération et la production d'IFN γ du clone T 8.3-CD8⁺ diabétogène. Les résultats indiquent que les CPA totales de la rate (CD, lymphocytes B et macrophages) des souris traitées au GM-CSF ont le même potentiel d'activation du clone T 8.3-CD8⁺ que les CPA de la rate des souris témoins. En effet, ce clone prolifère de façon similaire et produit la même quantité d'IFN γ lorsqu'il est mis en présence des CPA des souris traitées au GM-CSF ou de souris témoins (Fig. 10A) et Fig. 10B).

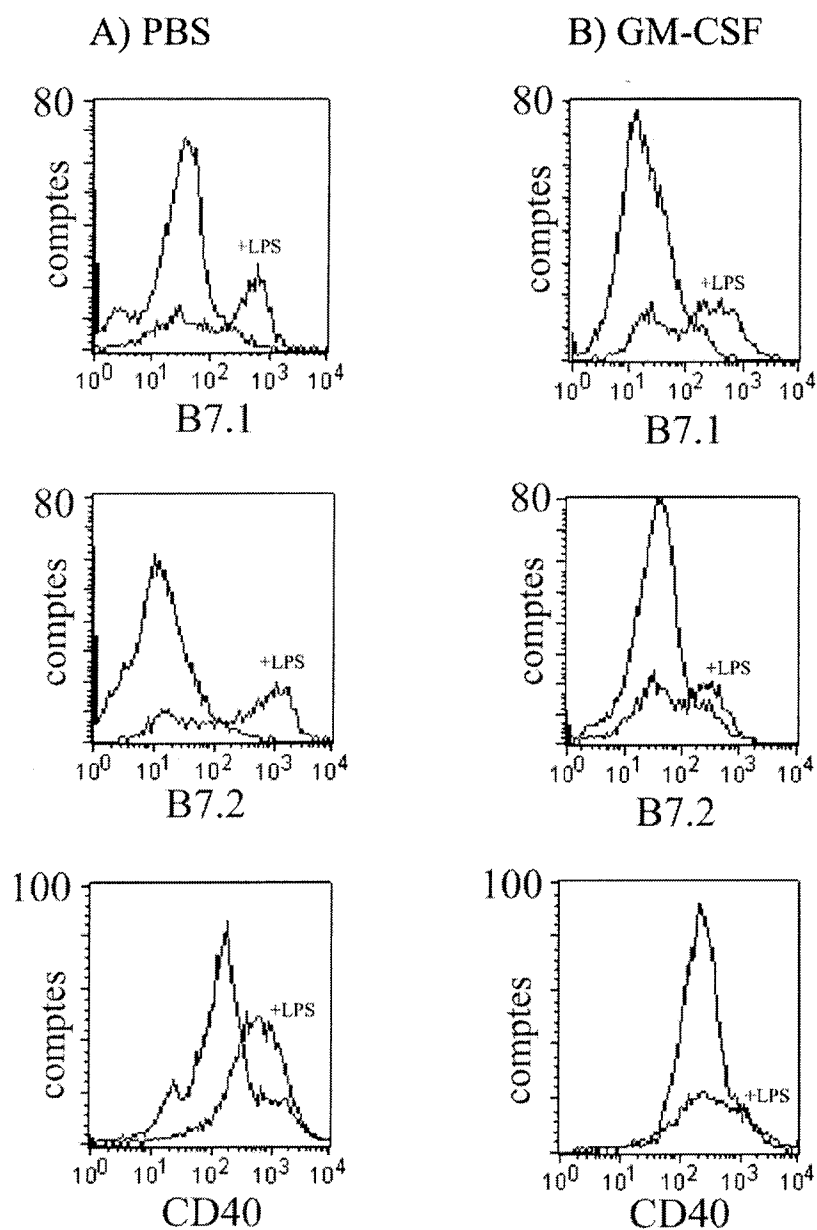


Figure 9. Effet inhibiteur du GM-CSF sur l'expression des marqueurs de surface des CD spléniques. Les CD ont été isolées à partir de la rate de souris traitées au PBS (A) ou au GM-CSF (B) et cultivées *in vitro* avec ou sans LPS (1 μ g/ml) pendant 48 h. L'expression des molécules de surface CD80, CD86 et CD40 a été déterminée par FACS. Les figures sont représentatives de 3 expériences par groupe.

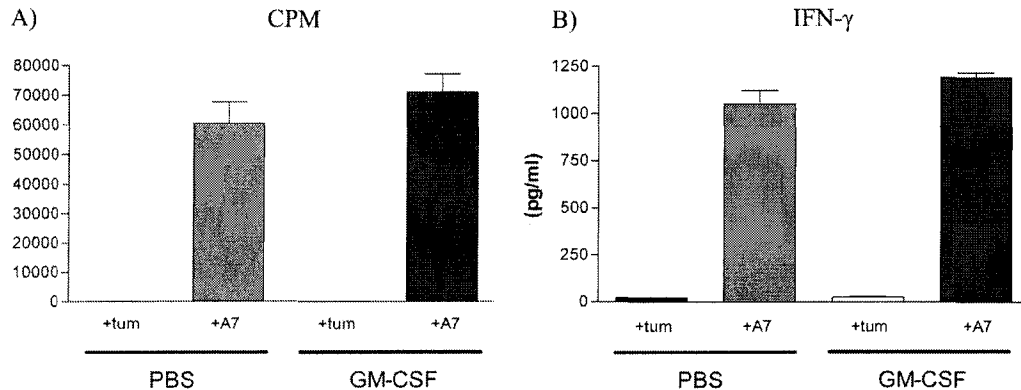


Figure 10. Présentation du peptide NRP-A7 par les APC des souris NOD traitées au GM-CSF ou au PBS. Les CPA (1×10^5) de la rate ont été irradiées et pulsées avec le peptide NRP-A7 ou le peptide TUM témoin ($1 \mu\text{g/ml}$) et mis en co-culture avec les lymphocytes T 8.3-CD8⁺ (2×10^4). A) Prolifération du clone T 8.3-CD8⁺ après 72 h de co-culture. B) Sécrétion d'IFN γ par le clone T 8.3-CD8⁺ après 48 h de co-culture. Les expériences sont représentatives de 2 souris par groupe et ont été réalisées en triplicata.

Étant donné qu'il n'y a pas de différence significative dans capacité de stimulation du clone T 8.3-CD8⁺ par les CPA totales et que les CD des souris traitées au GM-CSF présentent un phénotype immature, nous avons comparé la capacité de stimulation du clone T 8.3-CD8⁺ par les CD purifiées de la rate (qui représentent 1.5 à 3% des cellules totales). La capacité de stimulation des lymphocytes T 8.3-CD8⁺ des CD isolées de la rate des souris NOD traitées au GM-CSF est réduite d'environ 40% comparativement aux CD des souris témoins (Fig. 11A). Toutefois, cette diminution de la prolifération du clone T 8.3-CD8⁺ n'est pas accompagnée d'une diminution de production d'IFN γ . En effet, la quantité d'IFN γ produite est similaire à celle sécrétée par les CD8⁺ stimulés avec les CD des souris témoins (Fig. 11B).

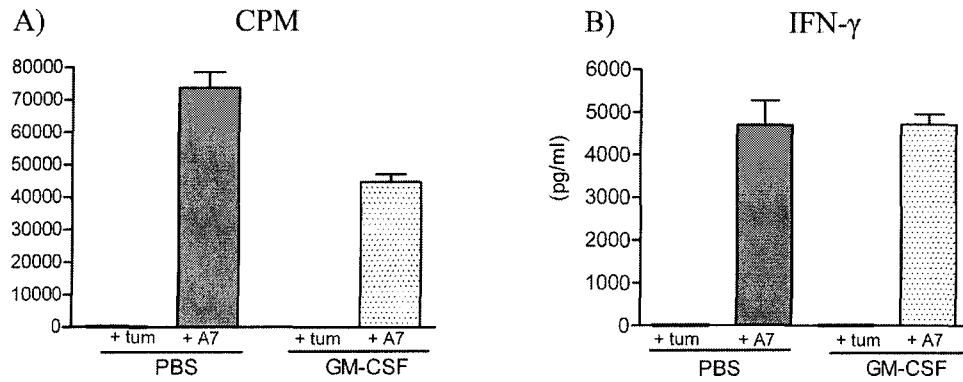


Figure 11. Présentation du peptide NRP-A7 par les CD purifiées des souris NOD traitées au GM-CSF ou au PBS. Les CD (1×10^4 cellules) de la rate ont été irradiés et pulsés avec le peptide NRP-A7 ou le peptide TUM témoin ($1 \mu\text{g/ml}$) et mis en co-culture avec les lymphocytes T 8.3-CD8⁺ (2×10^4). A) Prolifération du clone T 8.3-CD8⁺ après 72 h de co-culture. B) Sécrétion d'IFN γ par le clone T 8.3-CD8⁺ après 48 h de co-culture. Les expériences sont représentatives de 2 souris par groupe et ont été réalisées en triplicata.

5.7. Le GM-CSF, ne change pas le ratio de lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺, mais induit un phénotype de type Th2

L'analyse (FACS) des cellules de la rate et des ganglions pancréatiques et mésentériques montre que le traitement au GM-CSF n'a pas d'effet sur le ratio de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Fig. 12A, Fig. 12B et Fig. 12C). Nous avons ensuite déterminé si le traitement au GM-CSF influence le phénotype des lymphocytes T.

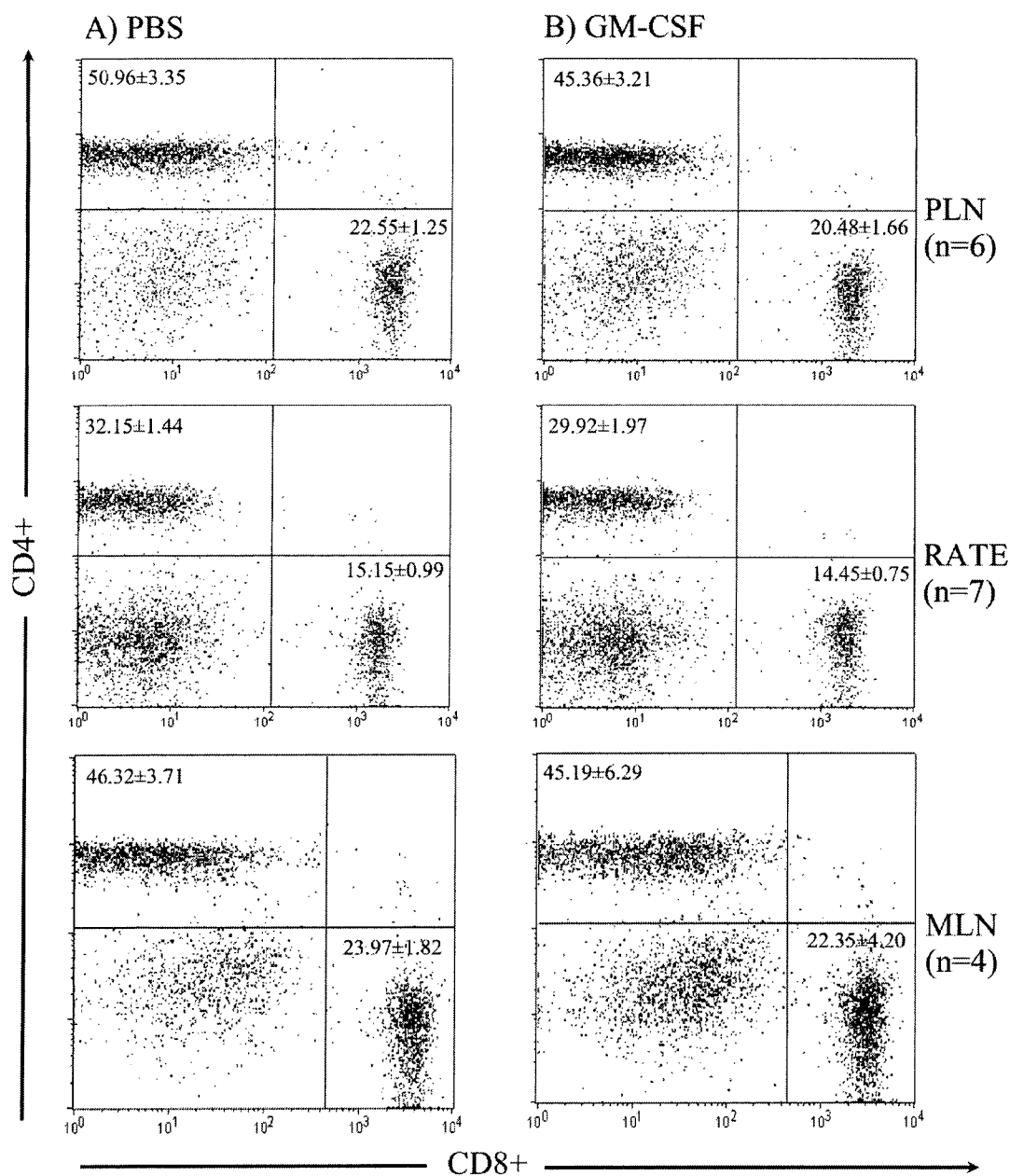


Figure 12. Pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ retrouvés dans les ganglions pancréatiques (A), la rate (B) et les ganglions mésentériques (C). L'analyse a été faite avec 4 à 7 souris par groupe.

Les lymphocytes T CD4⁺ des souris traitées au GM-CSF produisent davantage de cytokines de type Th2 lors de leur stimulation à l'anticorps anti-CD3 (5 µg/ml) et à l'IL-2 (10 U/ml). Les T CD4⁺ isolés de souris traitées au GM-CSF produisent plus d'IL-4 (3x) et d'IL-10 (4x) que les lymphocytes T CD4⁺ des souris témoins. Ces augmentations sont significatives à 48 h de stimulation (Fig. 13A et Fig. 13B). Par contre, il n'y pas de différence notable dans la sécrétion d'IFN γ et d'IL-2, deux cytokines associées à un phénotype Th2 même après 48 h de stimulation (Fig. 13C) et Fig. 13D).

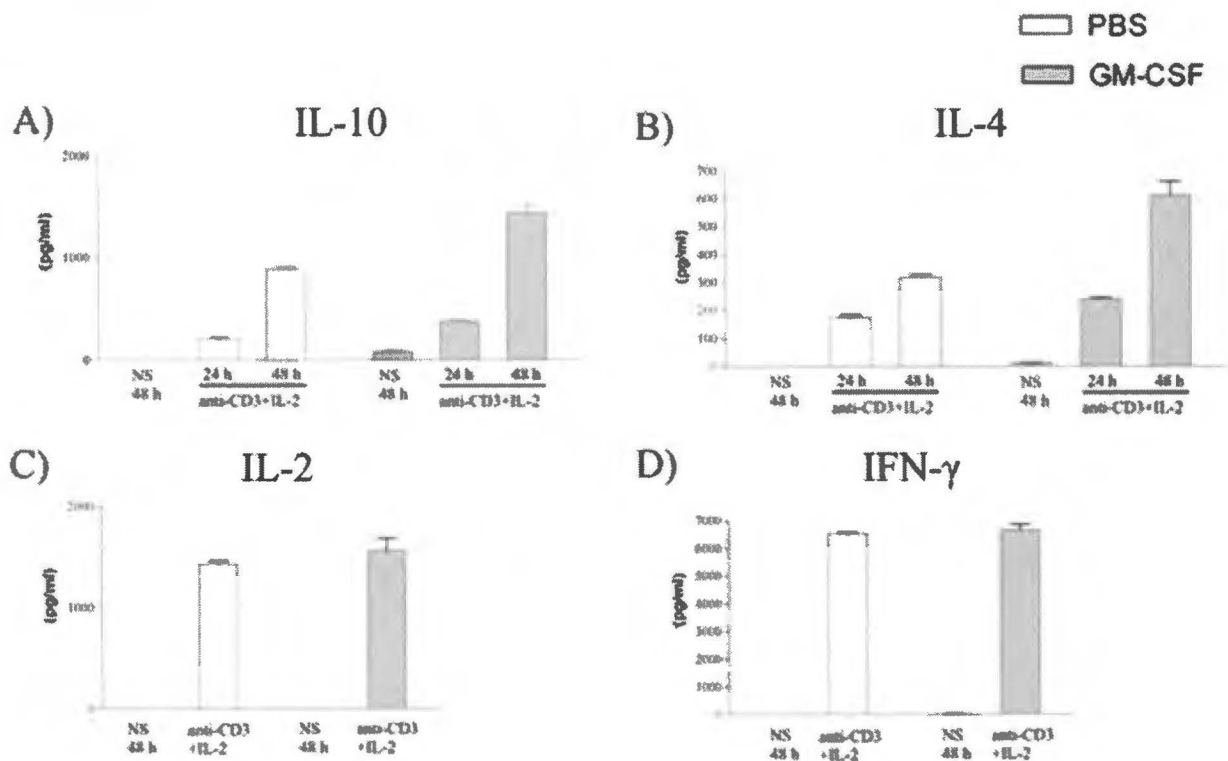


Figure 13. Production de cytokines *ex vivo* par les lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés de la rate et exposées pendant 24 ou 48 h à un milieu de culture contenant de l'IL-2 (10 U/ml) dans des plaques de 96 puits (1 x 10⁵ cellules/puits) enduites d'anticorps anti-CD3 (5 µg/ml). Les surnageants ont été récoltés et testés pour la présence d'IL-10 (A), d'IL-4 (B), d'IL-2 (C) et d'IFN γ (D). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences par groupe réalisées en triplicata.

5.8. Augmentation de la quantité de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ chez les souris traitées au GM-CSF

Il est connu que les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ (T_{reg}) sont importants pour le maintien de la tolérance périphérique. Une augmentation de cette population est associée à une protection contre le DT1 (Kareh et coll 2005, Chilton et coll. 2004). De plus, Serra et coll. (2003) ont démontré que le maintien des CD dans un état immature permet l'expansion des T_{reg}. Nous avons donc vérifié si le traitement au GM-CSF induisait une augmentation des T_{reg}. Les résultats ont montré que chez les souris traitées au GM-CSF, il y a une augmentation significative de la quantité de T_{reg} aussi bien dans les ganglions pancréatiques (Fig. 14A) dans la rate (Fig. 14B) et dans les ganglions mésentériques (Fig. 14C), comparativement aux souris témoins.

5.9. La production importante d'IL-10 et d'IL-4 est médiée par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺

La sécrétion des cytokines IL-10 et IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺ totaux suggère que le traitement au GM-CSF induit une réponse immune de type Th2. Puisque l'IL-10 et l'IL-4 peuvent être produits par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ et CD4⁺CD25⁻ nous avons purifié les deux populations afin de déterminer laquelle des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ était responsable de l'augmentation de la production d'IL-10 et d'IL-4.

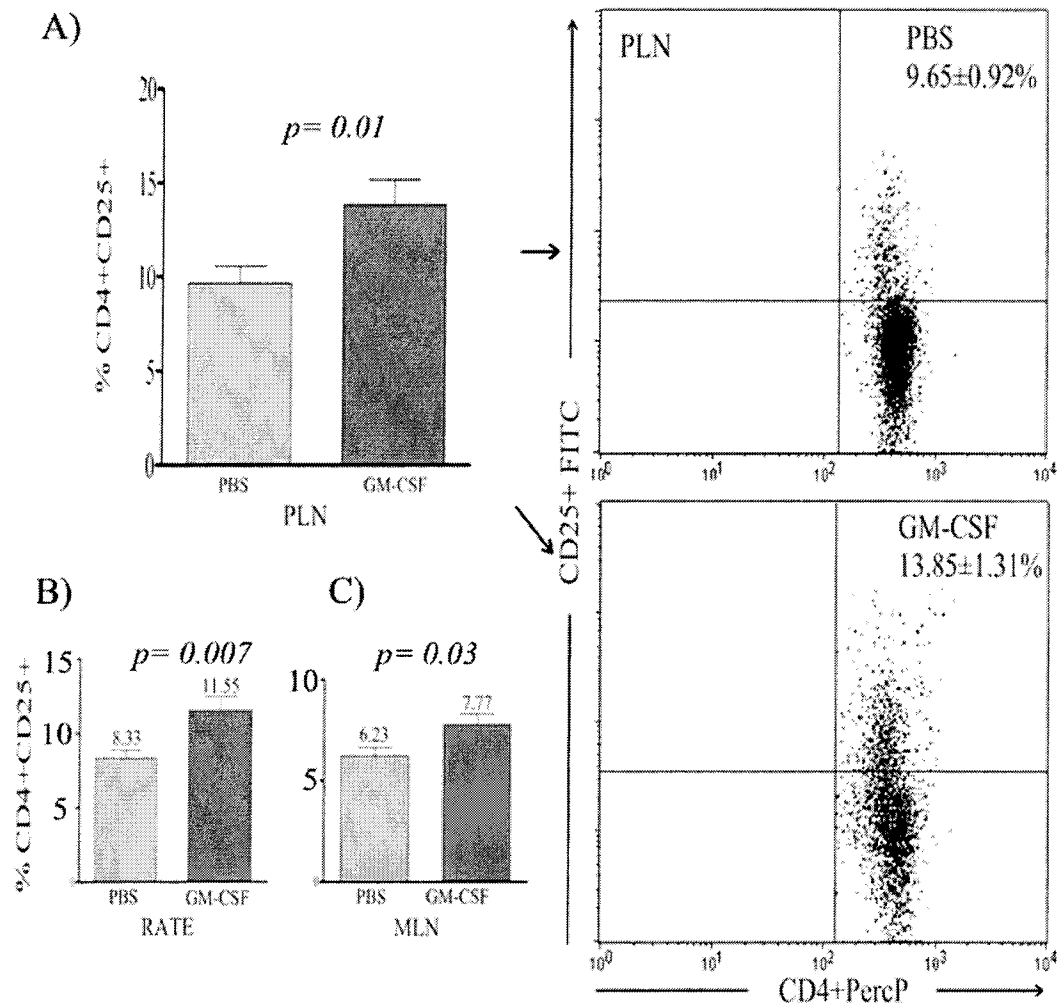


Figure 14. Effet du traitement au GM-CSF sur les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs. Les cellules ont été prélevées des différents organes de souris NOD de 32 semaines d'âge et plus protégées par traitement au GM-CSF (n = 11) ou de souris témoins diabétiques (n = 11) et marquées avec un anticorps anti-CD4-PercP et un anticorps anti-CD25-FITC. Les résultats indiquent le pourcentage de lymphocytes T CD25⁺ chez les lymphocytes T CD4⁺, (A) dans les ganglions pancréatiques, (B) dans la rate et (C) dans les ganglions mésentériques.

L'augmentation de la production des cytokines IL-10 (environ 3 fois) et IL-4 (environ 2 fois) observée chez les souris traitées au GM-CSF est due aux lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ (Fig. 15A et Fig. 15B). Il n'y a pas de différence significative dans la

production de ces deux cytokines chez les lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ des souris traitées au GM-CSF ou témoins. Le GM-CSF favoriserait donc l'expansion *in vivo* des lymphocytes T_{reg} ainsi que la différenciation d'une population de lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ sécrétant de plus grandes quantités de cytokines de type Th2.

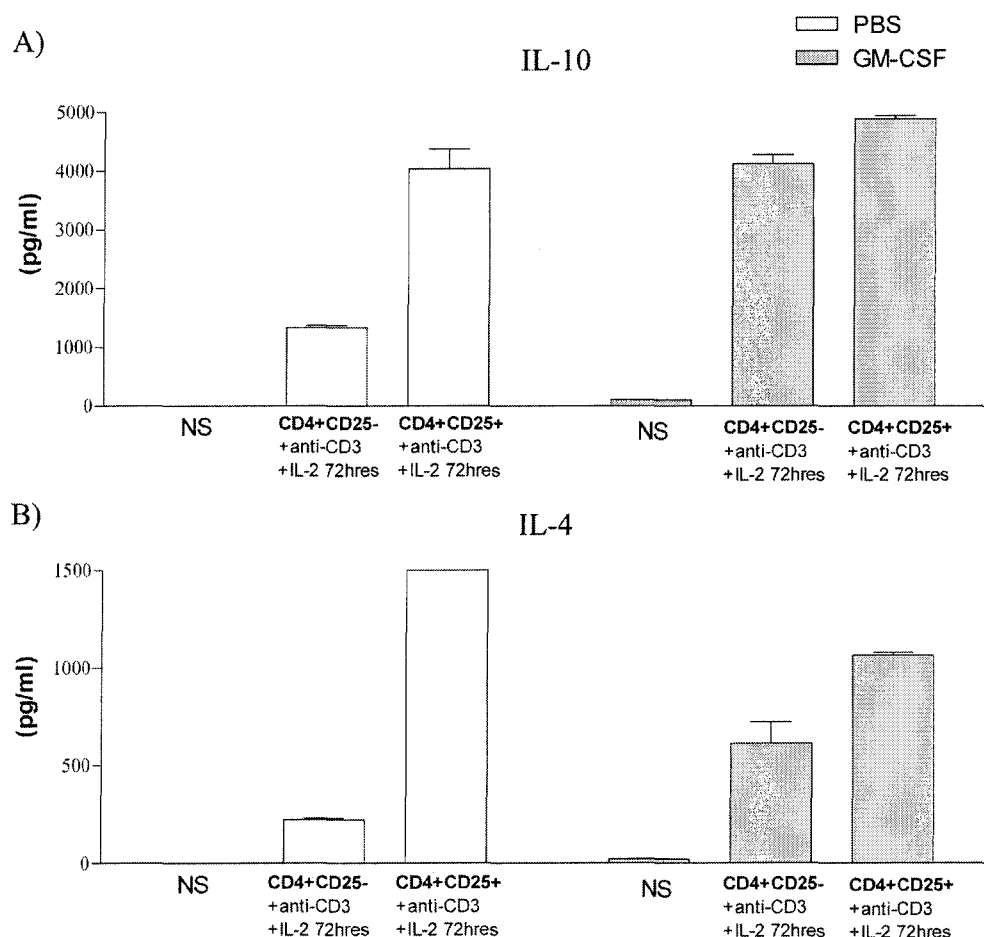


Figure 15. Production de cytokines *ex vivo* par les lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ et $CD4^+CD25^+$. Les lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ et $CD4^+CD25^+$ de la rate ont été exposés pendant 72 h à un milieu de culture contenant de l'IL-2 (10 U/ml) dans des plaques de 96 puits (1×10^5 cellules/puits) enduites d'anticorps anti-CD3 (5 μ g/ml). Les surnageants ont été récoltés et testés pour la présence d'IL-10 (A) et d'IL-4 (B). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences par groupe réalisées en triplicata.

5.10. Les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ inhibent l'activation du clone T 8.3-CD8⁺

Il est bien établi que les lymphocytes T_{reg} ont la capacité d'inhiber l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Dans le but d'évaluer cette capacité chez les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ résultant d'un traitement au GM-CSF, nous avons effectué des expériences de suppression. Ces expériences sont nécessaires pour savoir si ces T_{reg} induit jouent un rôle dans la protection contre le DT1 dans notre modèle. Pour ce faire, des CPA pulsées avec le peptide NRP-A7 ont été incubées avec le clone T 8.3-CD8⁺ en présence des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁻ provenant des souris traitées au GM-CSF ou de souris témoins. Les résultats obtenus indiquent que les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ inhibent de façon similaire la prolifération et l'activation du clone T 8.3-CD8⁺. En effet, la prolifération du clone T diabétogène est diminuée de 50% lorsque le ratio CD4⁺CD25⁺/CD8⁺ est de 1:1 ou de 2:1 (Fig. 16A). Nous avons aussi constaté que la production d'IFN γ et d'IL-2 (production proportionnelle au degré d'activation du clone diabétogène 8.3-CD8⁺) est diminuée d'environ 4 fois en présence des lymphocytes T_{reg} (Fig. 16B) et Fig 16C). Les résultats montrent également que les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ n'inhibent pas l'activation et la prolifération du clone T 8.3-CD8⁺, malgré leur forte production d'IL-10 et d'IL-4 (Fig. 15). Ces résultats suggèrent que le traitement au GM-CSF induit l'expansion de T_{reg} qui ont la même fonctionnalité que celle retrouvée chez les souris témoins.

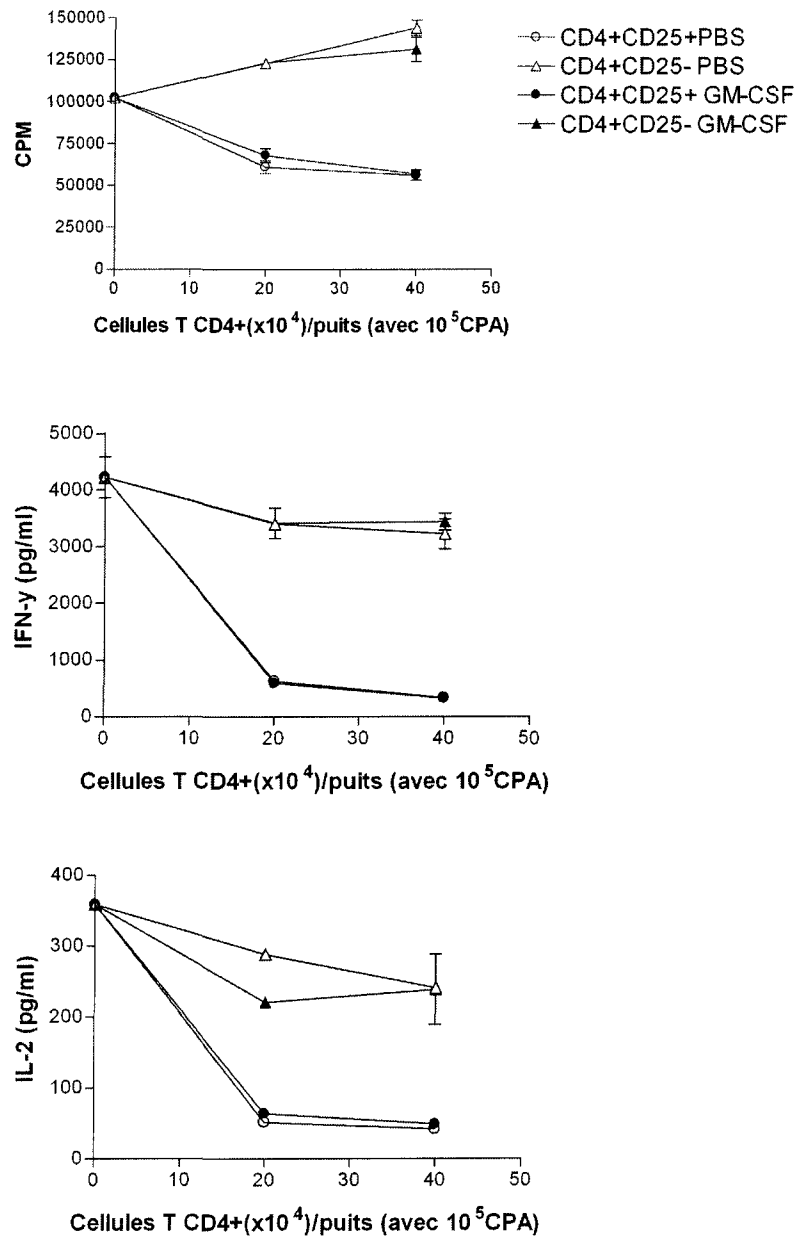


Figure 16. Capacité d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T 8.3-CD8⁺ par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁻, provenant des souris traitées au GM-CSF ou témoins. Des CPA totaux de souris (1 x 10⁵ cellules) NOD IDDM ont été irradiées (20 Gy) et pulsées avec le peptide NRP-A7 (1 µg/ml), puis mis en co-culture en présence de lymphocytes T 8.3-CD8⁺ (2 x 10⁴ cellules) et une quantité croissante de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁻ (2 x 10⁴ - 4 x 10⁴). A) Incorporation de [³H] thymidine après 72 h de co-culture, (B) Production d'IFNγ et (C) d'IL-2 par le clone 8.3-CD8⁺ après 48h de co-culture (dosage par ELISA).

5.11. Les cellules dendritiques des souris NOD traitées au GM-CSF sont essentielles au maintien de la tolérance *in vivo*

Sachant que le GM-CSF permet la génération de CD immatures tolérogènes et induit l'expansion des $T_{\text{rég}}$, nous avons évalué la capacité des cellules de la rate provenant des souris traitées au GM-CSF à induire la tolérance *in vivo* chez des souris NOD.*SCID*. Pour ce faire, nous avons injecté i.v. 8×10^6 splénocytes provenant de souris NOD traitées au GM-CSF de 32 à 40 semaines d'âge ou témoins diabétiques à des souris NOD.*SCID*. Contrairement à ce que l'on observe lorsqu'on effectue le transfert des splénocytes provenant de souris témoins, l'injection des splénocytes provenant des souris traitées au GM-CSF n'induit pas le diabète. Pour confirmer un rôle potentiel des CD dans cette tolérance, nous avons soustrait les CD (90% des CD sont enlevées, selon les analyses par FACS) avant d'effectuer le transfert des splénocytes. Dans ces expériences, l'apparition du DT1 est retardée par rapport aux souris témoins, mais le transfert des splénocytes, provenant de souris traitées au GM-CSF, sans les CD ne permet pas une protection contre le diabète chez les souris NOD.*SCID*, confirmant le rôle des CD dans cette protection (Fig. 17).

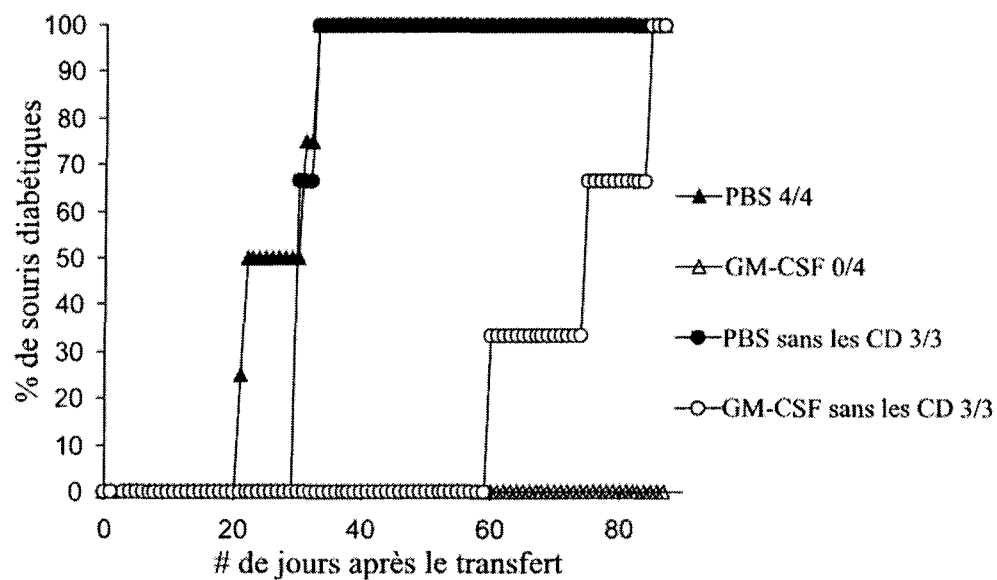


Figure 17. Importance des CD dans l'induction de la tolérance *in vivo*. Des souris NOD.SCID de 6 à 8 semaines ont été injectées avec 8×10^6 cellules de la rate totale ou 8×10^6 cellules de la rate sans les CD provenant des souris témoins diabétiques (▲ et ●) ou traitées au GM-CSF de 32 semaines (△ et ○). L'incidence du diabète a été mesurée tous les jours à partir de la 15^{ème} journée du transfert.

6. Discussion

Les CD sont non seulement des CPA professionnelles ayant une capacité accrue d'activation des lymphocytes T lors de la réponse immune, mais elles peuvent aussi induire la tolérance périphérique dans un contexte non inflammatoire (Steinman et coll. 2003). Nos résultats montrent qu'il est possible de générer une population de CD tolérogènes à partir de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse de souris NOD, lorsque ceux-ci sont cultivés en présence d'une faible concentration de GM-CSF. Ces résultats appuient les observations de Lutz et coll. (2000) effectuées chez une autre lignée de souris, soit les souris BALB/c (Fig. 4). Dans un même ordre d'idées, Vasu et coll. (2003) ont pour leur part montré que le traitement au GM-CSF permettait de protéger contre la thyroïdite autoimmune chez les souris CBA/J en favorisant l'expansion de CD tolérogènes. Cette étude nous a incité à vérifier s'il est possible de moduler la génération de CD immatures et tolérogènes chez la souris NOD traitée au GM-CSF afin d'induire une protection contre le DT1.

Tel qu'observé auparavant par Vasu et coll. (2003), les résultats de notre étude indiquent que le traitement au GM-CSF permet l'expansion des cellules CD *in vivo*. Nous observons une augmentation significative du nombre absolu de CD, mais celle-ci ne s'accompagne pas d'une splénomégalie. En effet, le nombre de cellules totales provenant de la rate de souris traitées au GM-CSF est similaire à celui retrouvé chez les souris témoins (Fig 7). Bien que dans plusieurs études les traitements effectués avec des facteurs de croissance de CD (GM-CSF, G-CSF et Flt-3) (Vasu et coll. 2003,

Chilton et coll. 2004, Kared et coll. 2005), permettent la génération de quantités de CD beaucoup plus importantes que ce que nous avons observé, ces traitements sont toujours associés à une splénomégalie. Cette observation peut s'expliquer par le fait que lors de ces études les auteurs ont traité les souris avec de grandes quantités de facteurs de croissance pour un court laps de temps. Dans notre protocole, nous avons favorisé un traitement à faible dose de GM-CSF sur une longue période, ce qui peut expliquer l'absence de splénomégalie chez nos souris traitées au GM-CSF.

Nous avons analysé le phénotype des CD retrouvées chez les souris traitées au GM-CSF afin d'identifier la population de CD qui peut être impliquée dans la protection contre le DT1 (Fig. 8). De façon intéressante, il n'y a pas de différences dans le pourcentage des populations de CD myéloïdes $CD11c^+CD11b^{+/-}$ et $CD11c^+CD8\alpha^{+/-}$. Il a été démontré que les CD $CD11c^+CD8\alpha^+CD11b^-$ induisent une réponse de type Th1 et que les CD $CD11c^+CD8\alpha^-CD11b^+$ favorisent l'induction d'une réponse Th2 *in vivo* (Maldonado-López et coll. 2001). En accord avec les résultats de Maldonado-López et coll., nous avons observé que le traitement au GM-CSF induit une réponse Th2 (augmentation de la production d'IL-10 et d'IL-4 chez les lymphocytes T $CD4^+$). Cette réponse immune de type Th2 peut être le résultat d'une augmentation du nombre absolu de la population de CD $CD11c^+CD8\alpha^-CD11b^+$ puisqu'il y a plus de CD chez les souris traitées au GM-CSF. La seule différence remarquée chez les souris traitées au GM-CSF est une augmentation de la population de CD exprimant $CD11c^{high}CD45rb^{low}$. Justement, Lutz et coll. (2000) ont décrit une population similaire de CD exprimant fortement le CD11c. Ces CD $CD11c^{high}$

permettent d'induire la tolérance dans un modèle expérimental de greffe chez la souris. Donc, il est possible que dans notre modèle ce soit cette population de CD $CD11c^{high}CD45rb^{low}$ qui permet l'induction de la tolérance, sans pour autant exclure la participation d'autres populations de CD tolérogènes. Fait à noter, nous ne savons pas si notre traitement induit les populations de CD tolérogènes de type plasmacytoïde ($CD11c^{low}B220^{+}$) (Kared et coll. 2005). Dans notre étude, l'ensemble des analyses réalisées sur les CD ont été faite sur les CD purifiées de la rate. Nous n'avons pas caractérisé le phénotype des CD résidentes au niveau des ganglions pancréatiques. Il n'est pas exclu que l'on retrouve également des CD immatures et/ou tolérogènes en plus grandes quantités dans ces ganglions ce qui empêcheraient l'activation des lymphocytes T diabétogènes (Amrani et coll. 2003). Des travaux futurs nous permettrons de mieux caractériser les CD induites par le traitement au GM-CSF.

Il est bien établi que le degré de maturation des CD joue un rôle essentiel dans l'induction de la tolérance périphérique *in vivo* en provoquant l'anergie des lymphocytes T ou l'expansion des lymphocytes $T_{reg} CD4^{+}CD25^{+}$ (Lutz et coll. 2002, Kleindienst et coll. 2005). Des analyses par FACS indiquent que les CD isolées des souris traitées au GM-CSF demeurent dans un état immature ou semi-mature, comparativement au CD des souris témoins (Fig. 9). En effet, l'expression des marqueurs de costimulation (CD80, CD86) et de CD40 reste faible même après stimulation au LPS, seulement chez les souris traitées au GM-CSF. De plus, ces CD^{imm} résistantes à la maturation ont une faible capacité de stimulation de la prolifération du clone T 8.3- $CD8^{+}$ hautement diabétogène *ex vivo*, sans toutefois

inhiber la production d'IFN γ (Fig. 11). Fait intéressant, il a été montré chez la souris NOD, comparativement aux souris résistantes au DT1 (NOR), que les CD ont une expression anormalement élevée de molécules de costimulation et que cette expression est plus élevée lors de la stimulation des lymphocytes T (Steptoe et coll. 2002). Par conséquent, nos résultats suggèrent que l'administration de faibles doses de GM-CSF aux souris NOD favorise le développement d'une population de CD^{imm} (possiblement CD11c^{high} CD45RB^{low}) résistante à la maturation similaire à celle qui a été décrite *in vitro* (Lutz et coll. 2000).

De plus, le traitement au GM-CSF favorise, chez les lymphocytes T CD4⁺, des changements phénotypiques importants chez les souris traitées au GM-CSF par rapport aux souris témoins, sans toutefois changer le ratio des lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺ (Fig. 12 et Fig. 13). De fait, les résultats obtenus avec les lymphocytes T CD4⁺ totaux purifiés indiquent que le traitement au GM-CSF favorise une réponse immune de type Th2, caractérisée par une forte production d'IL-10 et d'IL-4 sans différence significative dans la production d'IFN γ et d'IL-2 (Fig. 13). Dans ce contexte, il a été rapporté que le traitement au GM-CSF permet une réponse de type Th2 via les CD chez les souris Balb/c (Daro et coll. 2000, Daro et coll. 2002, Vasu et coll. 2003).

Même si les mécanismes par lesquels les CD permettent l'induction de la tolérance au DT1 lors du traitement au GM-CSF ne sont pas complètement résolus, nous observons aussi une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes

$T_{reg} CD4^+CD25^+$ chez les souris traitées au GM-CSF de 32 semaines (Fig. 14). Cette augmentation est beaucoup plus importante au niveau de la rate et des ganglions pancréatiques que dans les ganglions mésentériques. La présence accrue des $T_{reg} CD4^+CD25^+$ à un endroit propice pour supprimer l'activation des lymphocytes T diabétogènes, les ganglions drainant le pancréas, suggère leur implication dans la protection contre le DT1 chez les souris traitées au GM-CSF. Il est connu que les lymphocytes T_{reg} produisent de grandes quantités d'IL-10 et d'IL-4 (Cottrez et coll. 2004). L'isolement des populations $CD4^+CD25^+$ et $CD4^+CD25^-$ et leur stimulation *ex vivo* avec une combinaison d'un anticorps anti-CD3 et d'IL-2 nous a permis de constater que la production d'IL-10 et d'IL-4 chez les souris traitées au GM-CSF n'est pas due aux lymphocytes T $CD4^+CD25^+$, mais aux lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ (Fig. 15). Cette production, se fait de façon spontanée chez les lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ fraîchement isolés des souris traitées au GM-CSF sans stimulation *ex vivo*, ce qui signifie que les cellules sont déjà en état d'activation *in vivo*. Dans ce cas, le GM-CSF induit peut une population de lymphocytes T suppresseurs (Tr1) via les CD^{imm} . Ce phénomène a déjà été décrit par Groux et coll. (2004). Cependant, nous n'avons pas encore établi de façon définitive si la production élevée d'IL-10 et d'IL-4 par ces lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ peut être directement responsable de la protection contre le DT1. Nous sommes présentement en train de traiter des souris $NOD.IL10^{-/-}$ et $NOD.IL-4^{-/-}$ avec le GM-CSF afin de déterminer la contribution de ces deux cytokines dans notre modèle. Il est possible aussi que la protection contre le DT1 induite par le GM-CSF s'effectue par le biais des lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ (Dieckmann et coll.

2002). Fait intéressant, ces lymphocytes peuvent être induits par les CD^{imm} et l'IL-10 produite par les T CD4⁺CD25⁻ (Gad et coll. 2004, Amrani et coll. 2003).

Afin de déterminer la contribution des T CD4⁺CD25⁺ à la protection contre le DT1 nous avons effectué des expériences de suppression d'un clone T CD8⁺ diabétogène. Ces expériences ont révélé une inhibition de l'activation et de la prolifération du clone T 8.3-CD8⁺ par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ provenant de la rate des souris traitées au GM-CSF et témoins (Fig. 16). En effet, l'ajout des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺, à la co-culture des T 8.3-CD8⁺ et des CPA (pulsées avec le NRP-A7), diminue de façon importante la prolifération et la production d'IFN γ et d'IL-2 du clone T 8.3-CD8⁺. Ces résultats suggèrent que si la protection au DT1 induite par le traitement au GM-CSF est contrôlée par les lymphocytes T_{reg}, c'est grâce à une augmentation de leur nombre. Nous n'avons pas déterminé dans notre modèle les mécanismes moléculaires d'interaction utilisés par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ qui leur permet d'induire la suppression de l'activation du clone T 8.3-CD8⁺, cependant les résultats obtenus suggèrent que les T CD4⁺CD25⁺ provenant des souris traitées au GM-CSF conservent la même fonctionnalité que ceux provenant des souris témoins. Finalement, dans les deux groupes, les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ ne sont pas capables de supprimer l'activation du clone T 8.3-CD8⁺ diabétogène *in vitro* (Fig. 16.) Il est donc possible que le rôle des cellules T CD4⁺CD25⁻ dans la protection contre le DT1, chez les souris traitées au GM-CSF, soit d'empêcher la maturation des CD et de favoriser l'expansion des lymphocytes T_{reg} CD4⁺CD25⁺ par leur production élevée d'IL-10.

Chez les souris NOD traitées au GM-CSF nous avons observé une diminution du degré d'inflammation des îlots (Fig. 5). Cette diminution de l'insulite peut être causée par une inhibition de la différenciation des lymphocytes T autoréactifs naïfs en cellules effectrices au niveau des ganglions pancréatiques par les CD^{imm} ou les lymphocytes $T_{reg} CD4^+CD25^+$. Il est possible que les lymphocytes T naïfs, n'expriment pas le récepteur CXCR3, ce qui empêche leur migration dans les îlots du pancréas via le récepteur CXCL10 qui est exprimé sur les cellules β (Frigerio et al. 2002, Sarween et al. 2004). Une autre possibilité peut venir du fait que les populations cellulaires infiltrantes en périphérie de l'îlot chez les souris traitées au GM-CSF sont de nature tolérogènes et qu'elles empêchent l'inflammation via la sécrétion de cytokines immunosuppressives tel que l'IL-10, l'IL-4 et le TGF β . Des marquages immunohistochimiques spécifiques aux CD, macrophages et lymphocytes nous indiqueront quelles populations cellulaires sont présentes en périphérie des îlots chez les souris traitées au GM-CSF par rapport aux cellules infiltrantes chez souris traitées au PBS.

Finalement, l'absence des CD lors du transfert des splénocytes totaux ne permet pas une protection contre le DT1 chez les souris NOD.*SCID* (Fig. 17). Le retard observé dans l'apparition du DT1 lors de ces transferts est probablement dû à la présence plus élevée des T_{reg} chez les splénocytes des souris NOD traitées au GM-CSF. L'injection i.p. d'un anticorps anti-CD25 pour éliminer les lymphocytes T_{reg} avant le transfert des splénocytes ne contenant pas les CD nous permettra de répondre à cette question.

7. Conclusion

Nos résultats indiquent clairement que le traitement de souris NOD pré-diabétiques avec le GM-CSF protège contre le DT1. Cette protection est associée à une diminution de l'inflammation des îlots. Nos résultats suggèrent que la résistance au DT1 induite par le GM-CSF est causée par l'expansion de cellules dendritiques immatures résistantes à la maturation au LPS ayant un faible potentiel de stimulation et/ou par l'augmentation de la quantité de lymphocytes T_{reg} chez les souris NOD traitées au GM-CSF. Les mécanismes moléculaires d'inhibition de l'activation des lymphocytes T dans notre modèle ne sont pas encore tout à faits compris et ils sont présentement en cours d'investigation. Dans le but de confirmer le rôle physiologique du GM-CSF dans la protection contre le DT1, il serait intéressant de faire des études avec des souris NOD.*GM-CSF*^{-/-} ou des souris transgéniques exprimant le GM-CSF de façon «tissu spécifique» au niveau des CD. Ces expériences nous permettraient de mieux comprendre le rôle du GM-CSF dans l'induction de la tolérance des lymphocytes T diabétogènes. La figure 18 résume le mode d'action du GM-CSF dans la protection contre le DT1 chez la souris NOD, suite aux travaux effectués dans le cadre de ce mémoire.

L'objectif final de la recherche effectuée sur le DT1 est de trouver un traitement permanent de la maladie. Il appert que la modulation *in vivo* du système immunitaire par le GM-CSF chez les souris NOD protège contre le DT1 de manière efficace. Il serait peut être envisageable d'utiliser le GM-CSF comme immunorégulateur afin d'empêcher l'activation du système immunitaire chez l'homme et ainsi protéger les individus à risque (ceux qui ont les allèles de susceptibilité) contre

le développement du DT1. D'ailleurs récemment, le GM-CSF a été utilisé efficacement dans le traitement de la colite autoimmune chez l'homme (Wang et coll. 2005), alors pourquoi pas utiliser le GM-CSF dans le cas du DT1.

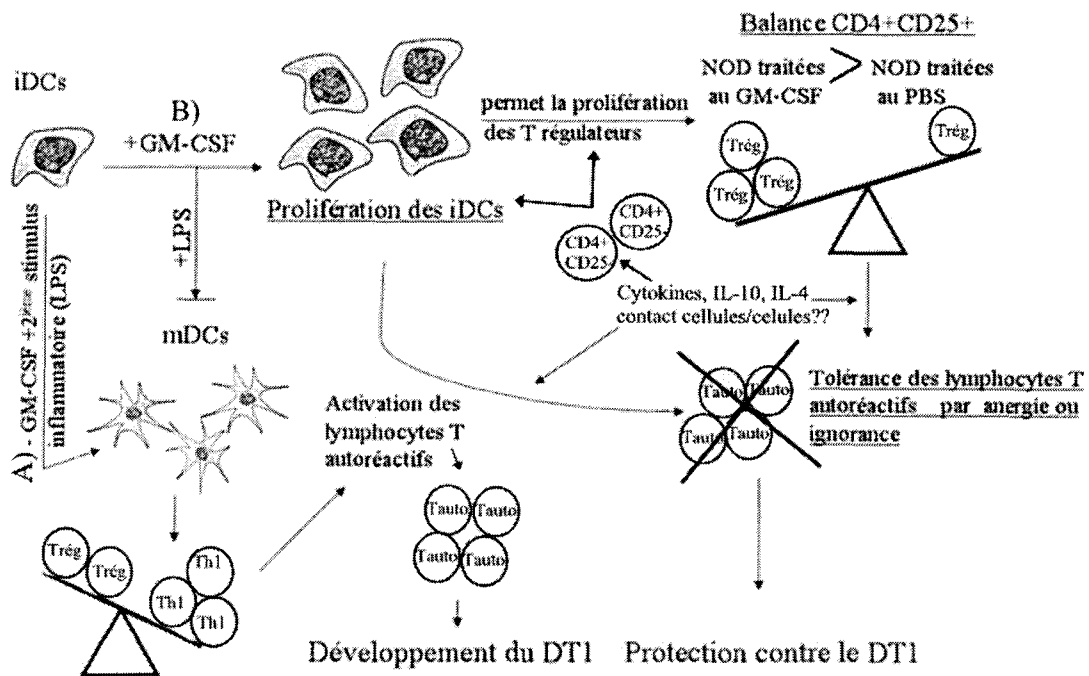


Figure 18. Résumé du rôle du GM-CSF dans la protection contre le DT1 chez la souris NOD. A) Chez les souris NOD traitées au PBS, les CD immatures se différencient en CD matures, après la capture des autoantigènes, lors de leur migration dans les ganglions lymphatiques. Les CD matures activent les lymphocytes T autoréactifs et induisent une réponse de type Th1. Ces lymphocytes migrent dans les îlots du pancréas et initient la destruction des cellules β . B) Chez les souris NOD traitées au GM-CSF, il y a une augmentation du pourcentage de CD dans les organes lymphoïdes. Ces CD ont un phénotype immature. Elles activent faiblement les lymphocytes T autoréactifs, et favorisent probablement l'expansion des lymphocytes T régulateurs. Les expériences de transfert chez les souris NOD.*SCID* confirment qu'elles sont essentielles à la protection contre le DT1 induite par le GM-CSF. Les lymphocytes T $CD4^+$ contribuent probablement à cette protection, en inhibant directement l'activation des lymphocytes T autoréactifs ($CD4^+CD25^+$) ou par leur grande production de cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10 et l'IL-4 ($CD4^+CD25^+$).

8. Remerciements

Dans la vie il y a des étapes à franchir et ces étapes se franchissent selon le rythme de chaque personne. J'ai eu la chance de faire un stage d'une année en Suisse ou j'ai travaillé dans les laboratoires des Drs Frédéric Lévy et Catherine Servis. C'est grâce à eux si j'ai choisi l'immunologie pour mes études avancées.

Il va sans dire que je tiens à remercier profondément les Dr Aziz Amrani et Claire Dubois pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche et pour leurs conseils judicieux. Les nombreuses discussions scientifiques tenues avec eux m'ont permis de développer mon sens critique et scientifique.

Aziz, tu m'as proposé un sujet de recherche passionnant et tu as toujours su m'encourager et me motiver pour mener à bien ma maîtrise. Tu as cru en moi, le défi était de taille: premier étudiant, nouveau laboratoire, nouvelles techniques... mais la détermination, la persévérance et la volonté, qualités que tu m'as inculquées m'ont permis de réussir, et je ne pourrai jamais assez te remercier pour ça.

Un grand merci, à Fernand et Louise pour avoir été des parents extraordinaires, et à mes frères Fred et Math, qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont toujours aidé.

Merci à tous mes amis, plus particulièrement à Alex, Chantal, Fred, Martin et Mike qui ont été des camarades extraordinaires aussi bien au laboratoire que dans la vie de tous les jours, ainsi qu'au Dr Gilles Dupuis, qui par sa sagesse et ses nombreux conseils m'a permis de réaliser à quel point la science est une belle aventure.

Finalement, je dédie ce mémoire à Marie-Sol, mon petit rayon de soleil.

9. Références

- Acha – Orbea H, McDevitt HO. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I–A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2435 – 2439.
- Akashi T, Nagafuchi S, Anzai K, Kondo S, Kitamura D, Wakana S, Ono J, Kikuchi M, Niho Y, Watanabe T. Direct evidence for the contribution of B cells to the progression of insulinitis and the development of diabetes in non obese diabetic mice. *Int Immunol* 1997; 9: 1159 – 1164.
- Alderuccio F, Biondo M, Toh BH. Organ-specific autoimmunity in granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) deficient mice. *Autoimmunity*. 2002; 35: 67 – 73.
- Amrani A, Verdaguer J, Serra P, Tafuro S, Tan R, Santamaria P. Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population. *Nature* 2000; 406: 739 – 742.
- Amrani A, Verdaguer J, Thiessen S, Bou S, Santamaria P. IL-1 α , IL-1 β , and IFN- γ mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4⁺ T-lymphocytes. *J Clin Invest* 2000; 105: 459 – 468.
- Amrani A, Verdaguer J, Anderson B, Utsugi T, Bou S, Santamaria P. Perforin independent β -cell destruction by diabetogenic CD8⁺ T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice. *J Clin Invest* 1999; 103: 1201 – 1208.
- Amrani A, Serra P, Yamanouchi J, Trudeau JD, Tan R, Elliott JF et coll.. Expansion of the antigenic repertoire of a single T cell receptor upon T cell activation. *J Immunol* 2001; 167: 655 – 666.
- Anderson JT, Cornelius JG, Jarpe AJ, Winter WE, Peck AB. Insulin-dependent diabetes in the NOD mouse model. II. Beta cell destruction in autoimmune diabetes is a TH2 and not a TH1 mediated event. *Autoimmunity* 1993; 15: 113 – 122.
- Anderson B, Park BJ, Verdaguer J, Amrani A, Santamaria P. Prevalent CD8⁺ T cell response against one peptide/MHC complex in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9311 – 9316.
- Anderson MS, Bluestone JA. THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 447–485.
- Andre I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: Lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2260 – 2263.

Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 2001; 22: 691 – 700.

Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 582 – 590.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 393: 245 – 252.

Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C. Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1947 – 1951.

Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfert of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cells. *J Exp Med* 1987; 166: 823 – 832.

Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G, Briere F. Human thymus contains IFN- α -producing CD11c(-), myeloid CD11c⁺, and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 835 – 844.

Biondo M, Nasa Z, Marshall A, Toh BH, Alderuccio F. Local transgenic expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor initiates autoimmunity. *J Immunol*. 2001; 166: 2090 – 2099.

Bischof RJ, Zafiroopoulos D, Hamilton JA, Campbell IK. Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation. *Clin Exp Immunol*. 2000; 119: 361 – 367.

Bohme J, Schuhbaur B, Kanagawa O, Benoist C, Mathis D. MHC – linked protection from diabetes dissociated from clonal deletion of T cells. *Science* 1990; 249: 293 – 295.

Boitard C, Bendelac A, Richard MF, Carnaud C, Bach JF. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by anti-I-A monoclonal antibodies: transfer of protection by splenic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 9719 – 9723.

Bousso P, Robey E. Dynamics of CD8⁺ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol*. 2003;4: 579 – 585.

Bradley BJ, Haskins K, La Rosa FG, Lafferty KJ. CD8 T cell are not required for islet destruction induced by a CD4⁺ islet-specific T cell clone. *Diabetes* 1992; 41:1603 – 1608.

Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Dunn AR, Grail D, Hamilton JA. Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol.* 1998; 161: 3639 – 3644.

Campbell IL, Iscrao A, Harrison LC. IFN- γ and tumor necrosis factor- α . Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol.* 1988; 141: 2325 – 2329.

Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA Jr, Matis D. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell.* 1997; 89: 17 – 24.

Chilton PM, Rezzoug F, Fugier-Vivier I, Weeter LA, Xu H, Huang Y, Ray MB, Ildstad ST. Flt3-ligand treatment prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2004; 53: 1995–2002.

Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 1993; 42: 44 – 55.

Clare-Salzler MJ, Brooks J, Chai A, Van Herle K, Anderson C. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *J Clin Invest.* 1992; 90: 741 – 748.

Cockfield SM, Ramassar V, Urmson J, Halloran PF. Multiple low dose streptozotocin induces systemic MHC expression in mice by triggering T cells to release IFN- γ . *J Immunol.* 1989; 142: 1120 – 1128.

Cottrez F, Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4⁺)CD(25⁺) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation.* 2004; 77: S12–5. Review.

Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001; 2: 203 – 209.

Dahlen E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol.* 1998;160: 3585 – 3593.

Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G. Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetes Care.* 1999; 22: 1698 – 1702.

Daro E, Butz E, Smith J, Teepe M, Maliszewski CR, McKenna HJ. Comparison of the functional properties of murine dendritic cells generated *in vivo* with Flt3 ligand, GM-CSF and Flt3 ligand plus GM-SCF. *Cytokine*. 2002; 17: 119 – 130.

Daro E, Pulendran B, Brasel K, Teepe M, Pettit D, Lynch DH, Vremec D, Robb L, Shortman K, McKenna HJ, Maliszewski CR, Maraskovsky E. Polyethylene glycol-modified GM-CSF expands CD11b^{high} CD11c^{high} but not CD11b^{low} CD11c^{high} murine dendritic cells *in vivo*: a comparative analysis with Flt3 ligand. *J Immunol*. 2000;165: 49–58.

Delovitch TL and Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 1997; 7: 727 – 738

Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med*. 2002;196: 247 – 253.

Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C, Vanbervliet B, Vicari A. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998; 188: 373 – 386.

Dilts SM, Solvason N, Lafferty KJ. The role of CD4 and CD8 T cells in the development of autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. 1999; 12: 229 – 232.

DiLorenzo TP, Graser RT, Ono T, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC, Nathenson SG, Serreze DV. MHC class I-restricted T-cells are required for all but end stages of diabetes development and utilize a prevalent T cell receptor α chain gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12538 – 12542.

Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5: 1365 – 1369.

Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3⁺ CD25⁺CD4⁺ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol*. 2004; 16: 1769 – 1780.

Feili-Hariri M, Dong X, Alber SM, Watkins SC, Salter RD, Morel PA. Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells. *Diabetes*. 1999; 48: 2300 – 2308.

Frigerio S, Junt T, Lu B, Gerard C, Zumsteg U, Hollander GA, Piali L. Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis. *Nat Med*. 2002; 8 : 1414 – 1420.

Fox CJ, Danska JS. Independent genetic regulation of T-cell and antigen-presenting cell participation in autoimmune islet inflammation. *Diabetes* 1998; 47: 331 – 338.

Fujino-Kurihara H, Fujita H, Hakura A, Nonaka K, Tarui S. Morphological aspects on pancreatic islets of non-obese diabetic (NOD) mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1985;49: 107 – 120.

Fundamental Immunology, Fifth Edition, William EP. 2003

Gad M, Kristensen NN, Kury E, Claesson MH. Characterization of T-regulatory cells, induced by immature dendritic cells, which inhibit enteroantigen-reactive colitis-inducing T-cell responses *in vitro* and *in vivo*. *Immunology*. 2004; 113: 499 – 508.

Gallegos AM, Bevan MJ. Driven to autoimmunity: the nod mouse. *Cell* 2004 117:149 – 151 .

Gangi E, Vasu C, Cheatem D, Prabhakar BS. IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol*. 2005; 174: 7006 – 7013.

Goldschneider I, Cone RE. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. *Trends Immunol*. 2003; 24: 77 – 81.

Graham J, Hagopian WA, Kockum I, Li LS, Sanjeevi CB, Lowe RM, Schaefer JB, Zarghami M, Day HL, Landin-Olsson M, Palmer JP, Janer-Villanueva M, Hood L, Sundkvist G, Lernmark A, Breslow N, Dahlquist G, Blohme G. Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1346 – 1355.

Green A, Gale EA, Patterson CC. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study. *Lancet* 1992; 11: 905 – 909.

Groux H, Fournier N, Cottrez F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2004; 16: 99 – 106. Review.

Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol*. 2005; 77: 3 – 15.

Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 1999; 189: 451 – 460.

Guiducci C, Valzasina B, Dislich H, Colombo MP. CD40/CD40L interaction regulates CD4⁺CD25⁺ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *Eur J Immunol*. 2005; 35: 557 – 567.

- Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors*. 2004; 22: 225 – 231.
- Hamilton JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*. 2002; 23: 403 – 408.
- Haskins K, McDuffie M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4⁺ islet-specific T cell clone. *Science* 1990; 249: 1433 – 1436.
- Haskins K. T-cell receptor transgenic (TCR-Tg) mice from two diabetogenic CD4⁺ islet-antigen-specific T-cell clones. *J Autoimmun*. 2004; 22: 107 – 109.
- Hawkes CH. Twin studies in diabetes mellitus. *Diabet Med* 1997; 14: 347 – 352.
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J Exp Med*. 2001; 194: 769 – 779.
- Hayward AR, Shreiber M. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol*. 1989;143:1555 – 1559.
- Held W, MacDonald HR, Weissman IL, Hess MW, Mueller C. Genes encoding tumor necrosis factor alpha and granzyme A are expressed during development of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 1990; 87: 2239 – 2243.
- Horn GT, Bugawan TL, Long CM, Erlich HA. Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: relationship to serology and to insulin-dependent diabetes susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 6012 – 6016.
- Homo-Delarche F, Drexhage HA. Immune cells, pancreas development, regeneration and type 1 diabetes. *Trends Immunol*. 2004;25: 222 – 229.
- Hultgren B, Huang X, Dybdal N, Stewart TA. Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1996; 45: 812 – 817.
- Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells *in situ* and during maturation *in vitro*. *J Exp Med* 1994; 180: 1849 – 1860.
- Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein Mip-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000; 191: 1381 – 1394.

Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 1994; 43: 667 – 675.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000; 192: 1213 – 1222.

Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1999; 189: 347 – 358.

Jun HS, Santamaria P, Lim HW, Zhang ML, Yoon JW. Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8⁺ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice *Diabetes* 1999; 48: 34 – 42.

Kagi D, Odermatt B, Seiler P, Zinkernagel R, Mak T, Hengartner H. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1997; 186: 989 – 997.

Kared H, Masson A, Adle-Biassette H, Bach JF, Chatenoud L, Zavala F. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells. *Diabetes* 2005; 54: 78 – 84.

Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia* 1993; 36: 883 – 892.

Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspect of type 1 diabetes. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 1 – 10.

Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity*. 2004; 20: 529 – 538. Review.

Kleindienst P, Wiethe C, Lutz MB, Brocker T. Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semimature dendritic cells. *J Immunol*. 2005; 174: 3941 – 3947.

Knip M, Akerblom HK. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107: 93 – 100.

Koch F, Stanzl U, Jennewein P, et coll.. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1996; 184: 741 – 746.

Krakowski M, Abdelmalik R, Mocnik L, Krah T, Sarvetnick N. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) recruits immune cells to the pancreas and delays STZ-induced diabetes. *J Pathol.* 2002; 196: 103 – 112.

Kurrer M, Pakala S, Hanson H, Katz J. β -cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 213 – 218.

Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC, Linsley PS, Lowry RP. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 1992; 176: 1215 – 1220

Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, Herold KC, Bluestone JA. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med.* 1995; 181: 1145 – 1155.

Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8⁺ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100: 8384 – 8388.

Lee KU, Amano K, Yoon JW. Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes.* 1988; 37: 989-991.

Lee MS, Chang I, Kim S. Death effectors of β -cell apoptosis in type 1 diabetes. *Mol Gen and Metabolism* 2004; 83: 82 – 92.

Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001; 106: 259 – 262.

Luhder F, Hoglund P, Allison JP, Benoist C, Mathis D. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 1998; 187: 427–32.

Torben Lund, Lorraine O'Reilly, Patricia Hutchings, Osami Kanagawa, Elizabeth Simpson, Robert Gravely, Phillip Chandler, Julian Dyson, Jean K. Picard, Andrew Edwards, Dimitris Kioussis, Anne Cooke, Hutchings P, Kanagawa O, Simpson E, Gravely R, Chandler P, Dyson J, Picard JK, Edwards A. Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transgenes encoding modified I-A beta-chain or normal I-E alpha-chain. *Nature* 1990; 345: 727 – 729.

Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rossner S, Schuler G, Austyn JM. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*. *Eur J Immunol*. 2000; 30: 1813 – 1822.

Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*. 2002; 23: 445 – 449.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1995; 154: 5071 – 5079.

Maldonado-López R, Moser M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol* 2001; 13: 275 – 282.

Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen LD, Mølvi J, Pociot F, Johannesen J and Nerup J. Cytokines and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 164: 169 – 193.

Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001; 97: 3333 – 3341.

Marleau AM, Singh B. Myeloid dendritic cells in non-obese diabetic mice have elevated costimulatory and T helper-1-inducing abilities. *J Autoimmun*. 2002; 19: 23 – 35.

Mathis D, Vence L, Benoist C. Beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001; 414: 792 – 798.

Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Uguccioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med*. 2003; 198: 615 – 621.

Marusic S, Miyashiro JS, Douhan J 3rd, Konz RF, Xuan D, Pelker JW, Ling V, Leonard JP, Jacobs KA. Local delivery of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by retrovirally transduced antigen-specific T cells leads to severe, chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neurosci Lett*. 2002; 332: 185 – 189.

McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CC. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2001; 194: 873 – 882.

Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106: 255 – 258.

Miller MJ, Safrina O, Parker I, Cahalan MD. Imaging the single cell dynamics of CD4⁺ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med*. 2004; 200: 847 – 856.

Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*. 2004; 172: 4676 – 4680.

Miyazaki T, Uno M, Uehira M, Kikutani H, Kishimoto T, Kimoto M, Nishimoto H, Miyazaki J, Yamamura K. Direct evidence for the contribution of the unique I-ANOD to the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 1990; 345: 722 – 724.

Miyazaki T, Matsuda Y, Toyonaga T, Miyazaki J, Yazaki Y, Yamamura K. Prevention of autoimmune insulinitis in nonobese diabetic mice by expression of major histocompatibility complex class I Ld molecules. *PNAS*. 1992; 89: 9519 – 9523.

Mora C, Wong FS, Chang CH, Flavell RA. Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA-deficient mice. *J Immunol* 1999;162: 4576 – 4588.

Morahan G, Morel L. Genetics of autoimmune diseases in humans and in animal models. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14: 803 – 811.

Morin J, Chimenes A, Boitard C, Berthier R, Boudaly S. Granulocyte-dendritic cell unbalance in the non-obese diabetic mice. *Cell Immunol*. 2003; 223: 13 – 25.

Mueller C, Held W, Imboden MA, Carnaud C. Accelerated beta-cell destruction in adoptively transferred autoimmune diabetes correlates with an increased expression of the genes coding for TNF-alpha and granzyme A in the intra-islet infiltrates. *Diabetes* 1995; 44 :112 – 117.

Nagata M, Santamaria P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon JW. Evidence for the role of CD8⁺ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic β -cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1994; 152: 2042 – 2050.

Nikolic T, Bunk M, Drexhage HA, Leenen PJ. Bone marrow precursors of nonobese diabetic mice develop into defective macrophage-like dendritic cells *in vitro*. *J Immunol*. 2004; 173: 4342 – 4351.

Noorchashm H, Lieu YK, Noorchashm N, Rostami SY, Greeley SA, Schlachterman A, Song HK, Noto LE, Jevnikar AM, Barker CF, Naji A. I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1999;163: 743 - 750.

Oldenhove G, de Heusch M, Urbain–Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, Moser M. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells *in vivo*. J Exp Med. 2003; 198: 259 – 266.

Oriss TB, Ostroukhova M, Seguin–Devauux C, Dixon–McCarthy B, Stolz DB, Watkins SC, Pillemer B, Ray P, Ray A. Dynamics of dendritic cell phenotype and interactions with CD4⁺ T cells in airway inflammation and tolerance. J Immunol. 2005; 174: 854 – 863.

Ou D, Mitchell LA, Metzger DL, Gillam S, Tingle AJ. Cross–reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type I diabetes mellitus Diabetologia. 2000; 43: 750 – 762.

Pakala SV, Chivetta M, Kelly C, Katz J. In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha. J Exp Med 1999; 189: 1053 – 1062.

Peng R, Li Y, Brezner K, Litherland S, Clare–Salzler MJ. Abnormal peripheral blood dendritic cell populations in type 1 diabetes. Ann N Y Acad Sci. 2003; 1005: 222 – 225.

Peterson JD, Berg R, Piganelli JD, Poulin M, Haskins K. Analysis of leukocytes recruited to the pancreas by diabetogenic T cell clones. Cell Immunol. 1998; 189: 92 – 98.

Peterson JD, Haskins K. Transfer of diabetes in the NOD–scid mouse by CD4 T cell clones. Differential requirement for CD8T cells. Diabetes 1996; 45: 328 – 336.

Podolin PL, Denny P, Lord CJ, Hill NJ, Todd JA, Peterson LB, Wicker LS, Lyons PA. Congenic mapping of the insulin–dependent diabetes (Idd) gene, Idd10, localizes two genes mediating the Idd10 effect and eliminates the candidate Fcgr1. J Immunol. 1997; 159: 1835 – 1843.

Polychronakos C. Animal models of spontaneous autoimmune diabetes: notes on their relevance to the human disease. Curr Diab Rep. 2004; 4: 151 – 154.

Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD–1 and CTLA–4. Nat Immunol. 2005; 6: 280 – 286.

Probst HC, Lagnel J, Kollias G, van den Broek M. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8⁺ T cell tolerance. Immunity. 2003; 18: 713 – 720.

Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses *in vivo*. J Immunol 2001; 167: 5067 – 5076.

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. Biochem Pharmacol. 1998; 55: 1139 – 1149.

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. Endocrinology. 1996; 137: 2093 – 2099.

Randolph GJ. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. Semin Immunol. 2001; 13: 267 – 274. Review.

Reddy S, Kaill S, Poole CA, Ross J. Inducible nitric oxide synthase in pancreatic islets of the non-obese diabetic mouse: a light and confocal microscopical study of its ontogeny, co-localization and up-regulation following cytokine administration. Histochem J. 1997 ; 29: 53 – 64.

Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. Diabetologia 2001; 44: 927.

Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. Diabet Med. 2005; 4: 359 – 370.

Reis e Sousa C, Yap G, Schulz O, et coll.. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. Immunity 1999; 11: 637 – 647.

Rosmalen JGM, Leenen PJM, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. Trends Endocrinol Metab. 2002; 5: 209 – 214.

Rosmalen JGM, Homo-Delarche F, Durant S, Kap M, Leenen PJ, Drexhage HA. Islet abnormalities associated with an early influx of dendritic cells and macrophages in NOD and NODscid mice. Lab. Invest. 2000; 80: 769 – 777.

Rosmalen JGM, van Ewijk W, Leenen PJ. T-cell education in autoimmune diabetes: teachers and students. Trends Immunol. 2002; 1: 40 – 46

Rothe H, Burkart V, Faust A, Kolb H. Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. Diabetologia 1996; 39: 119 – 122

- Rotter JJ, Vadheim CM, Petersen GM, Cantor RM, Riley WJ, Maclaren NK. HLA haplotype sharing and prob and genotype in IDDM. *Genet Epidemiol Suppl.* 1986; 1: 347 – 352.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2760 – 2769.
- Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* 2003; 24: 314 – 319.
- Sarween N, Chodos A, Raykundalia C, Khan M, Abbas AK, Walker LS. CD4⁺CD25⁺ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol.* 2004; 173: 2942 – 2951.
- Savinov AY, Tcherepanov A, Green EA, Flavell RA, Chervonsky AV. Contribution of Fas to diabetes development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 628 – 632.
- Sempe P, Bedossa P, Richard MF, Villa MC, Bach JF, Boitard C. Anti- α/β T cell receptor monoclonal antibody provides an efficient therapy for autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur J Immunol.* 1991; 21: 1163 – 1169.
- Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, Verdaguer J, Santamaria P. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunity.* 2003; 19: 877 – 889.
- Serra P, Amrani A, Han B, Yamanouchi J, Thiessen SJ, Santamaria P. RAG-dependent peripheral T cell receptor diversification in CD8⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15566 – 15571.
- Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Gerling I, Leiter EH, Shultz LD. Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I-dependent. *J Immunol* 1997; 158: 3978 – 3986.
- Serreze DV, Leiter EH. Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 900 – 906.
- Serreze DV, Leiter EH, Christianson GJ, Greiner D, Roopenian DC. Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2mnull mice are diabetes and insulinitis resistant. *Diabetes* 1994; 43: 505 – 509.
- Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1998;161: 3912 – 3918.
- Shizuru JA, Fathman CG. Anti-CD4 antibodies in diabetes. *Immunol. Ser.* 1993; 59: 237 – 252.

Signore A, Pozzilli P, Gale EA, Andreani D, Beverley PC. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia*. 1989; 32: 282 - 289.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 2: 685 – 711.

Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75: 5132 – 5136.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973; 137: 1142 – 1162.

Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol* 2003 ;51: 59 – 60.

Stephens RJ, Ritchie JM, Harrison LC. Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2002; 168: 5032 – 5041.

Stephens RJ, Ritchie JM, Jones LK, Harrison LC. Autoimmune diabetes is suppressed by transfer of proinsulin-encoding Gr-1⁺ myeloid progenitor cells that differentiate *in vivo* into resting dendritic cells. *Diabetes*. 2005; 54: 434 – 442.

Strid J, Lopes L, Marcinkiewicz J, Petrovska L, Nowak B, Chain BM, Lund T. A defect in bone marrow derived dendritic cell maturation in the nonobese diabetic mouse. *Clin Exp Immunol*. 2001; 123: 375 – 381.

Suarez-Pinzon W, Rajotte RV, Mosmann TR, Rabinovitch A. Both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in syngeneic islet grafts in NOD mice produce interferon-gamma during beta-cell destruction. *Diabetes*. 1996; 45: 1350 – 1357.

Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2003; 171: 3348 – 3352.

Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25⁺ CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.*; 2004 199: 1467 – 1477.

Thivolet C, Bendelac A, Bedossa P, Bach JF, Carnaud C. CD8⁺ T cell homing to the pancreas in the non obese diabetic mouse is CD4⁺ T cell-dependent. *J Immunol* 1991; 146: 85 – 88.

Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1987; 329: 599 – 604.

Toyoda H, Formby B, Magalong D, Redford A, Chan E, Takei S, Charles MA. In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett*. 1994; 39: 283 – 288.

Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J. Exp. Med*. 2003; 198: 1527 – 1537.

Utsugi T, Yoon JW, Park BJ, Imamura M, Averill N, Kawazu S, Santamaria P. Major histocompatibility complex class I-restricted infiltration and destruction of pancreatic islets by NOD mouse-derived β -cell cytotoxic CD8⁺ T-cell clones *in vivo*. *Diabetes* 1996; 45: 1121 – 1131.

Varela-Calvino R, Ellis R, Sgarbi G, Dayan CM, Peakman M. Characterization of the T-cell response to coxsackievirus B4: evidence that effector memory cells predominate in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51: 1745 – 1753.

Vasquez AC, Feili-Hariri M, Tan RJ, Morel PA. Qualitative and quantitative abnormalities in splenic dendritic cell populations in NOD mice. *Clin Exp Immunol*. 2004; 135: 209 – 218.

Vasu C, Dogan RN, Holterman MJ, Prabhakar BS. Selective induction of dendritic cells using granulocyte macrophage-colony stimulating factor, but not fms-like tyrosine kinase receptor 3-ligand, activates thyroglobulin-specific CD4⁺CD25⁺ T cells and suppresses experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol*. 2003; 170: 5511 – 5522.

Verdaguer J, Schmidt D, Amrani A, Anderson B, Averill N, Santamaria P. Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1997; 186: 1663 – 1676.

Verdaguer J, Yoon JW, Anderson B, Averill N, Utsugi T, Park BJ, Santamaria P. Acceleration of spontaneous diabetes in TCR- β -transgenic nonobese diabetic mice by β -cell cytotoxic CD8⁺ T cells expressing identical endogenous TCR- α chains. *J Immunol* 1996; 157: 4726 – 4735.

Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. *Immunity*. 2003; 18: 605 – 617.

Wang J, Mayer L, Cunningham-Rundles C. Use of GM-CSF in the treatment of colitis associated with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 1092 - 1094.

Wasmuth HE, Hess G, Viergutz C, Henrichs HR, Martin S, Kolb H. Non-specific viral infections as possible synchronising events of the manifestation of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000; 16: 177 – 178.

Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 179–200.

Wong F, Visintin I, Wen L, Flavell R, Jr CJ. CD8 T cell clones from young NOD islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 T cells. *J Exp Med* 1996; 183:67 – 76.

Wucherpfennig KW. Insights into autoimmunity gained from structural analysis of MHC – peptide complexes. *Curr Op Immunol*. 2001; 13: 650 – 656.

Yagi H, Matsumoto M, Kunimoto K, Kawaguchi J, Makino S, Harada M. Analysis of the roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfert to NOD athymic nude mice. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2387 – 2393
Diabetologia. 1996; 39: 1306 – 1312.

Yamada K, Takane-Gyotoku N, Yuan X, Ichikawa F, Inada C, Nonaka K. Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. *Diabetologia*. 1996; 39: 1306 – 1312.

Wang B, Gonzalez A, Benoist C, Mathis D. The role of CD8⁺ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* . 1996; 26: 1762 – 1769.

Yang Y, Santamaria P. T-cell receptor-transgenic NOD mice: a reductionist approach to understand autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. 2004; 22: 121 – 129.

Yang XD, Tisch R, Singer SM, Cao ZA, Liblau RS, Schreiber RD, McDevitt HO. Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med*. 1994; 180: 995 – 1004.

Zacher T, Knerr I, Rascher W, Kalden JR, Wassmuth R. Characterization of monocyte-derived dendritic cells in recent-onset diabetes mellitus type 1. *Clin Immunol*. 2002; 105: 17–24.

Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kundig T, Hengartner H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 1997; 156: 199 – 209.